

Hemmung der Thrombozytenaktivierung durch Natrium-4-methyl-piperidyl-diazeniumdiolat

Dissertation zur Erlangung
des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von: Anne Schaarschmidt
geboren am 06.01.1981 in Jena

Gutachter:

1. PD Dr. Wolfgang Lösche, Universität Jena
2. Prof. Dr. Erika Glusa, Universität Jena
3. PD Dr. Artur-Aron Weber, Universität Düsseldorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.07.2007

Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ASS	Azetylsalizylsäure
CD	Cluster of differentiation
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
GP	Glycoprotein
GSNO	S-Nitroso-Glutathion
GTN	Glyzeroltrinitrat
HWZ	Halbwertszeit
IC ₅₀	inhibitorische Konzentration mit 50%iger Hemmung
IBMX	3-Isobutyl-1-methylxanthin
4-MEPI-NO	Natrium1-(4-methyl-1piperidyl)-diazen-1-ium-1,2-diolat
NO	Stickstoffmonoxid
ODQ	1 <i>H</i> -(1,2,4)Oxadiazolo-(4,3,-a)quinoxalin-1-one
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung (phosphate buffered saline)
PE	Phycoerythrin
PMV	Platelet-derived microvesicles
PPP	Plättchen-armes Plasma (= platelet poor plasma)
PRP	Plättchen-reiches Plasma (= platelet rich plasma)
PSGL-1	P-Selectin-Glykoprotein-Ligand 1
PTCA	perkutane transluminale koronare Angioplastie
RPE	R-Phycoerythrin
RSNO	S-Nitrosothiol
SERCA	Sarkoplasmatische Ca ²⁺ -ATPase
SNP	Natriumnitroprussid (= Sodiumnitroprussid)
TXA ₂	Thromboxan A ₂
vWF	von Willebrand Faktor

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	6
2. Einleitung	8
2.1 Blutplättchen	8
2.1.1 Struktur und Funktion der Blutplättchen	8
2.1.1.1 Plättchenaktivierung	8
2.1.1.2 Ablauf der Aggregation	10
2.1.1.3 Bedeutung von CD62P und Plättchen-Leukozyten-Konjugaten	11
2.1.2 Physiologische und medikamentöse Inhibitoren der Plättchenfunktion	12
2.1.3 Erkrankungen mit Plättchenhyperreaktivität oder Endotheldysfunktion	15
2.2 NO	15
2.2.1 NO-Wirkung	15
2.2.2 Klinisch verwendete NO-Donatoren	17
2.2.3 Diazeniumdiolate	18
2.2.4 Einsatz von NO-Donatoren zur Plättchenhemmung	19
3. Zielsetzung	20
4. Methodik	21
4.1 Material	21
4.1.1 Substanzen	21
4.1.2 Geräte	21
4.2 Methoden	22
4.2.1 Blutentnahme und Herstellung von plättchenreichem und plättchenarmem Plasma	22
4.2.2 Gebrauchslösungen der Plättcheninhibitoren und -aktivatoren und anderer Testsubstanzen	22
4.2.3 Inkubation von PRP und Vollblut mit 4-MEPI-NO und SNP	23
4.2.4 Turbidimetrische Messung der Plättchenaggregation	23
4.2.5 Durchflusszytometrie	24
4.2.5.1 Aggregation im Vollblut und PRP	25
4.2.5.2 Expression von CD62P auf der Plättchenoberfläche	25
4.2.5.3 Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten	26

4.2.6	ELISA zur Bestimmung der cGMP-Spiegel	26
4.3	Statistik	27
5.	Ergebnisse	28
5.1	Hemmung der Plättchenaggregation und Plättchenaktivierung	28
5.1.1	Hemmung der ADP- und Collagen-induzierten Aggregation im PRP durch 4-MEPI-NO im Vergleich zu SNP	28
5.1.2	Hemmung der Mikro- und Makroaggregatbildung im PRP	32
5.1.3	Vergleichende Messung der Hemmung der Aggregation im Vollblut und im PRP	35
5.1.4	Vergleich der Messung der Aggregation im PRP mittels PAP4C und Durchflusszytometrie	37
5.1.5	Hemmung der CD62P-Expression im Vollblut und PRP und Hemmung der Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten	38
5.2	Untersuchungen zur Wirkdauer und zum Wirkmechanismus	43
5.2.1	Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO nach Inkubation im Vollblut sowie Langzeitinkubation im PRP	43
5.2.2	Plasmatauschexperimente	45
5.2.3	Rolle der Guanylatzyklase für die Hemmung der Plättchenaggregation durch 4-MEPI-NO und SNP	47
5.2.3.1	Einfluss von ODQ auf die Wirkung von SNP und 4-MEPI-NO im PRP	47
5.2.3.2	Einfluss von ODQ auf die cGMP-Spiegel nach 4-MEPI-NO- oder SNP-Stimulation	49
6.	Diskussion	50
7.	Schlussfolgerungen	68
8.	Literaturverzeichnis	69
9.	Anhang	76

1. Zusammenfassung

Hintergrund Plättchenaktivierung und Plättchenaggregation gehören zu den wesentlichen physiologischen Vorgängen im Rahmen der primären Hämostase. Sie sind ebenfalls pathophysiologisch relevant bei der Entwicklung der Atherosklerose, bei der arteriellen Thrombose bei Myokardinfarkten und Restenosierungen nach perkutaner Koronarintervention (Huo und Ley 2004, Rauch et al. 2001, Janero und Ewing 2000). Trotz wichtiger Verbesserungen in der Therapie der arteriellen Thrombose in den letzten Jahren besteht weiterhin ein Bedarf an neuen Substanzen, die sowohl die Thrombenbildung effektiv unterbinden können als auch das Blutungsrisiko nicht zu stark erhöhen, und die auch langfristig gegeben werden können (Rauch et al. 2001).

Ein wichtiges Therapieziel ist neben der Hemmung der Aggregation die Hemmung der Plättchenaktivierung, welche bei den GPIIb/IIIa-Antagonisten kaum vorhanden ist (Matzdorff et al. 2001, Klinkhardt et al. 2002, Caron et al. 2002). Die Plättchenaktivierung führt über Kontakte zwischen aktivierten Plättchen und Leukozyten sowie durch Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer und proliferativ wirksamer Substanzen zur Induktion von Entzündungsvorgängen. Von der Hemmung der Plättchenaktivierung verspricht man sich daher eine anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkkomponente, die positive Auswirkungen auf die Progression der Atherosklerose haben könnte (André 2004).

NO-Donatoren werden in der Klinik bisher zur Vasodilatation eingesetzt, haben aber auch eine plättchenhemmende Wirkkomponente. Der Einsatz von NO-Donatoren zur Plättchenhemmung wäre ein vielversprechendes Wirkprinzip, da der physiologische Botenstoff NO, der bei Atherosklerose vermindert ist (Anderson 2003, Janero und Ewing 2000, Freedman und Loscalzo 2003), so ersetzt werden könnte. In der Vielzahl der NO-Donatoren stellen die Diazeniumdiolate eine relativ neue und vorteilhafte Substanzgruppe dar. Sie zeichnen sich vor allem durch eine spontane und verlässliche NO-Freisetzung im physiologischen Milieu aus (Fitzhugh und Keefer 2000).

Fragestellungen und Ziele In der vorliegenden Arbeit wurde die NO-freisetzende Substanz Natrium-4-methyl-piperidyl-diazeniumdiolat hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Plättchenaggregation und Plättchenaktivierung untersucht. Weiterhin sollten Aussagen zur Zeitdauer der Wirkung, zur Wirkung in Anwesenheit von Erythrozyten und zum Wirkmechanismus getroffen werden.

Methodik Die Versuche wurden im PRP und Vollblut gesunder Probanden durchgeführt. Die Bestimmung der Aggregation erfolgte turbidimetrisch mit der Methode nach Born (Born 1962). Der Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Mikroaggregatbildung wurde mit dem Laseraggregometer bestimmt. Mittels Durchflusszytometrie wurden die CD62P-Expression und Aggregation im PRP und Vollblut, und die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten im Vollblut erfasst. CD62P und Plättchen-Monozyten-Konjugate gelten als sensitive Marker der Plättchenaktivierung (André 2004, Furie et al. 2001). Aussagen zur Signaltransduktion konnten durch den Einsatz des Hemmstoffs der Guanylatzyklase ODQ und Messung der cGMP-Spiegel getroffen werden.

Ergebnisse und Diskussion 4-MEPI-NO zeigte eine potente Hemmung der Aggregation und CD62P-Expression im PRP, wobei die Hemmung der CD62P-Expression deutlich sensitiver war. Es konnte eine vergleichbar gute Hemmung der Aggregation erzielt werden wie bei bekannten Substanzen (NO-Donatoren, GPIIbIIIa-Antagonisten). Im Vergleich zur Makroaggregatbildung reagierte die Mikroaggregatbildung weniger empfindlich auf 4-MEPI-NO. Im Vollblut war keine relevante Hemmung der Aggregation und CD62P-Expression zu verzeichnen, wobei der Wirkungsverlust vermutlich auf eine Bindung an Hämoglobin zurückzuführen ist. Trotz kurzer Halbwertszeit (105s) bestand eine lange Wirkung in vitro im Plasma (über 75min), die vermutlich auf eine Konservierung von NO durch Plasmakomponenten zurückgeht. Überraschenderweise war bei Inkubation im Vollblut nach Entfernung der Erythrozyten die Wirkung uneingeschränkt erhalten. Die Wirkung von 4-MEPI-NO auf die Plättchenaggregation war im Gegensatz zur Vergleichssubstanz SNP cGMP-unabhängig.

Schlussfolgerungen Bei potenter Hemmung der Plättchenaggregation und -aktivierung in vitro im PRP, ist die Wirksamkeit von 4-MEPI-NO in vivo ungewiss.

2. Einleitung

2.1 Blutplättchen

2.1.1 Struktur und Funktion der Blutplättchen

Blutplättchen oder Thrombozyten sind kernlose, scheibenförmige Zellabschnürungen vielkerniger Megakaryozyten mit einem Durchmesser von 3-5µm. Ihre Zahl im Blut beträgt 150.000-300.000 pro µl. Die Lebenszeit eines Plättchens liegt zwischen 8 und 10 Tagen (Gawaz 1999, Vorchheimer und Becker 2006).

Plättchen enthalten eine Vielzahl an Granula. Dominierend sind hierbei die α-Granula, die u.a. CD62P, Fibrinogen, Fibronectin, „platelet derived growth factor“ (PDGF), von Willebrand Faktor (vWF), Thrombospondin, Plättchenfaktor 4, Gerinnungsfaktor 5 enthalten. Daneben kommen dichte Granula (dense bodies) vor, welche Serotonin, Calcium-Ionen, Adenosindiphosphat (ADP) und Adenosintriphosphat enthalten (Gawaz 1999). Plättchen verfügen über ein „offenes kanalikuläres System“ (= surface connected system). Dieses besteht aus Invaginationen der Plättchenmembran, die in offener Verbindung mit der Umgebung stehen und ein Membranreservoir für den Gestaltwandel im Rahmen der Aktivierungsreaktion darstellen. Während der Freisetzungsreaktion fusionieren die Speichergranula mit dem offenen kanalikulären System (Gawaz 1999).

Die Plättchenoberfläche wird von zahlreichen Rezeptoren bedeckt. Mit etwa 50.000 Kopien pro Plättchen ist Glykoprotein IIbIIIa (GPIIbIIIa) der häufigste Rezeptor auf der Plättchenoberfläche (Lefkovits et al. 1995). GPIIbIIIa ist verantwortlich für die irreversible Plättchenaggregation. Aktiviertes GPIIbIIIa bindet Fibrinogen und führt damit aufgrund der dimeren Struktur des Fibrinogens zur Brückenbildung zwischen aktivierten Plättchen (Lefkovits et al. 1995).

Die Hauptfunktion der Plättchen besteht in der Thrombusbildung über einer Gefäßverletzung im Rahmen der primären Hämostase. Daneben sind sie aber auch an Gerinnung, Entzündung, Gewebsreparatur und Atherogenese beteiligt (Alonso und Radomski 2003, Vorchheimer und Becker 2006).

2.1.1.1 Plättchenaktivierung

Ruhende Plättchen haben eine diskoide Gestalt. Bei Aktivierung machen die Plättchen einen Gestaltwandel durch, sie runden sie sich ab und bilden Pseudopodien aus. Zahlreiche Auslöser der Plättchenaktivierung sind bekannt. Physiologisch und pathophysiologisch relevant sind v.a. Collagen, Thrombin, ADP, Plättchen aktivierender Faktor, Adrenalin und

mechanische Scherkräfte. Dabei kann zwischen starken Agonisten wie Collagen und Thrombin und schwachen Agonisten wie Serotonin oder Thromboxan A₂ (TXA₂) unterschieden werden (Gawaz 1999).

Die Bindung der Auslöser an ihre Rezeptoren führt zur Aktivierung von G-Proteinen, Proteinkinasen, Phospholipasen und des Arachidonsäure-Metabolismus, und nachgeschaltet zu einer Erhöhung der intrazytoplasmatischen Calcium-Konzentration. Das zytoplasmatische Calcium wird dabei als der dominante Second-messenger der Plättchenaktivierung angesehen (Jackson et al. 2003). Die Aktivierungsreaktion weist einen sequentiellen Verlauf auf, wobei anfangs durch Veränderungen im Zytoskelett der Gestaltwandel erfolgt. Dieser ist verbunden mit einer gesteigerten Adhäsivität und einer Konformationsänderung des GPIIb/IIIa-Komplexes, die zu einer erhöhten Affinität zum Liganden Fibrinogen führt. Anschließend erfolgt eine zunächst noch reversible Aggregation der Plättchen und die Freisetzung der Granulainhaltsstoffe, die weitere Plättchen rekrutieren und so die Aktivierungsreaktion weiter verstärken. Schließlich kommt es zur irreversiblen Aggregation. Die Aggregation stellt die gemeinsame Endstrecke der verschiedenen Stimuli dar (Lefkovits et al. 1995).

Neben der Aggregation hat die Plättchenaktivierung weitere Folgen. Die sezernierten Inhaltstoffe der Granula führen zur Vasokonstriktion (v.a. durch Serotonin) und zur Induktion einer Entzündungsreaktion. Langfristig können freigesetzte Substanzen wie PDGF zur Gefäßmuskelproliferation führen (Huo und Ley 2004). Aktivierte Plättchen adhären über CD62P an Monozyten und neutrophile Granulozyten und führen zur Steigerung der Reaktionslage der Leukozyten („Priming“) und zur Induktion der Zytokinproduktion (Huo und Ley 2004). Weiterhin können aktivierte Plättchen über die Bindung von Gerinnungsfaktoren und Exposition von Phospholipiden die Gerinnung aktivieren (Vorchheimer und Becker 2006).

Schließlich geht die Aktivierung der Plättchen mit der Freisetzung von Mikrovesikeln (PMV) einher. PMV enthalten Plättchen-typische Oberflächenmoleküle und proinflammatorische Faktoren (André 2004, Huo und Ley 2004). Sie können mit anderen Zellen verschmelzen und ihre Inhaltsstoffe und Rezeptoren auf diese übertragen. Daneben können PMV auch zur Brückenbildung zwischen verschiedenen Zelltypen wie Endothel, Leukozyten und Plättchen beitragen (André 2004).

2.1.1.2 Ablauf der Aggregation

Die Plättchenaggregation *in vivo* ist ein komplexer Prozess im Rahmen der Thrombusbildung. Nach dem von Jackson et al. vorgestellten Modell lässt sich die Aggregation *in vivo* in drei Teilprozesse gliedern (Jackson et al. 2003):

1. Initial kommt es zur Adhäsion von Plättchen an vWF über den GPIb/V/IX-Rezeptor. Dies führt zur Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels. Die Stimulation ist auch durch Bindung an Collagen (Rezeptoren sind Integrin $\alpha_2\beta_1$, GPVI), Fibronectin oder Laminin möglich. vWF ist vor allem bedeutsam bei hohen arteriellen Flussraten.
2. Im nächsten Schritt kommt es zur Plättchen-Plättchen-Kohäsion (Tethering). Adhärenente Plättchen präsentieren an ihrer Oberfläche aktives GPIIb/IIIa und vWF und setzen ADP sowie TXA₂ frei. Dadurch werden weitere Plättchen rekrutiert.
3. Abschließend kommt es zur Aggregation durch Brückenbildung zwischen aktivierten GPIIb/IIIa-Molekülen via Fibrinogen oder vWF. Dies führt zur weiteren Potenzierung des intrazellulären Calciumsignals mit Verstärkung der ADP-Freisetzung. ADP potenziert über Bindung an den P₂Y₁₂-Rezeptor die GPIIb/IIIa-Aktivierung. Die Aggregation wird irreversibel. Der Prozess der irreversiblen Aggregation ist von GPIIb/IIIa abhängig (Jackson et al. 2003, Kulkarni et al. 2000). Die Kostimulation durch lösliche Agonisten wie ADP und TXA₂ ist notwendig, um die eher schwachen Signale durch Adhäsion (via vWF, GPIb/V/IX, GPIIb/IIIa) zu verstärken und eine stabile Aggregation zu erreichen (Jackson et al. 2003).

Die *in vitro* durchgeführte Aggregometrie im plättchenreichen Plasma (PRP) stellt ein vereinfachtes Model der Aggregation dar. So fehlen Endothel und Leukozyten, die Aggregation wird durch lösliche Agonisten ausgelöst. Diese aktivieren GPIIb/IIIa vom niedrig- zum hochaffinen Fibrinogen-Rezeptor, der über Bindung von Fibrinogen zur stabiler Brückenbildung zwischen den Plättchen führt (Kulkarni et al. 2000).

Verstärkungswege der Aktivierung und Aggregation

Drei wichtige Verstärkungswege im Aktivierungsprozess sind bekannt.

ADP wird von aktivierten Plättchen freigesetzt und bindet an die Rezeptoren P₂Y₁ und P₂Y₁₂. Dadurch wird eine durch andere Stimuli ausgelöste Plättchenaktivierung oder -aggregation verstärkt, wobei das Signal am P₂Y₁-Rezeptor vermutlich wichtig für die Initiierung der Thrombusbildung ist, während P₂Y₁₂ eine stabile Thrombusbildung vermittelt. Die Verstärkung der Aktivierung durch ADP ist v.a. bei hohen Flussraten bedeutsam (Jackson et al. 2003).

Einen weiteren Verstärkungsweg stellt **TXA₂** dar, das ebenfalls von aktivierten Plättchen freigesetzt wird. Die Inhibierung dieses Verstärkungsweges durch Azetylsalizylsäure (ASS) kann die Aggregation bei niedrigen Flussraten, jedoch nicht bei hohen Flussraten (Jackson et al. 2003) oder bei starken Stimuli (Matsuno et al. 1999) reduzieren.

Thrombin ist ein sehr potenter Plättchen-Agonist und kann verschiedene Rezeptoren aktivieren, u.a. GPIb/V/IX. Die Freisetzung von Thrombin ist ein wichtiger Verstärkungsweg v.a. bei niedrigen und mittleren Flussraten. Thrombin führt zur Quervernetzung von Fibrin und ist damit möglicherweise v.a. bedeutsam für die Stabilisierung bereits gebildeter Thromben (Jackson et al. 2003, Rauch et al. 2001).

Mikroaggregate

Im Verlauf der Aggregation werden zunächst kleine Aggregate gebildet, die sich weiter zu mittleren und großen Aggregaten entwickeln (Miyamoto et al. 2003). Mikroaggregate spielen damit eine Schlüsselrolle bei der Initiierung der Aggregation (Matsuno et al. 1999). Eine vermehrte Mikroaggregatbildung bei Stimulation *in vitro* ist ein unabhängiger Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse (Miyamoto et al. 2003) und die spontane Bildung von Mikroaggregaten *in vitro* ist erhöht bei Patienten mit akutem Koronarsyndrom und chronischer koronarer Herzkrankheit (McBane et al. 2003). ASS kann die Mikroaggregatbildung nicht verhindern (Miyamoto et al. 2003). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass GPIIb/IIIa-Antagonisten die Mikroaggregatbildung geringer inhibieren als die Makroaggregatbildung (Storey et al. 1998, Matzdorff et al. 2001). Durch Messung der Lichttransmission können nur Makroaggregate, jedoch keine Mikroaggregate erfasst werden (Matsuno et al. 1999, Storey et al. 1998). Mit Hilfe anderer Techniken wie Laseraggregometrie, Einzelplättchenzählung und Durchflusszytometrie kann jedoch auch die Mikroaggregatbildung gemessen werden.

2.1.1.3 Bedeutung von CD62P und Plättchen-Leukozyten-Konjugaten

CD62P wird auf Plättchen und Endothel exprimiert (André 2004). Bei ruhenden Plättchen befindet sich CD62P in den α -Granula und wird bei der Plättchen-aktivierung im Rahmen der Degranulation auf die Oberfläche gebracht. CD62P gilt als verlässlicher Marker der Plättchenaktivierung und Degranulation (André 2004, Furie et al. 2001).

Vorrangiger und hochaffiner Ligand des CD62P ist der auf Leukozyten exprimierte P-Selectin-Glykoprotein-Ligand-1 (PSGL-1). CD62P vermittelt via PSGL-1 die Bindung von Plättchen an neutrophile Granulozyten und Monozyten und vermittelt somit Interaktionen

zwischen Plättchen und Leukozyten, Plättchen und Endothel und zwischen Leukozyten und Endothel (André 2004).

Plättchen-Leukozyten-Konjugate führen zum „Priming“ von Plättchen und Leukozyten, was mit einer verstärkten Reaktivität einhergeht. So führt CD62P bei Leukozyten zu vermehrter Zytokinsynthese (Huo und Ley 2004), bei Monozyten auch zur Expression von Tissue Faktor (André 2004, Furie et al. 2001). Aus diesem Grund wird die Hemmung der Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten als Marker für eine anti-inflammatorische Wirkung von Anti-Plättchen-Wirkstoffen angesehen (André 2004).

Plättchen-Monozyten-Konjugate gelten als sensibler Parameter für Gefäßerkrankungen (André 2004). Erhöhte Spiegel von Plättchen-Monozyten-Konjugaten oder CD62P-positiven Plättchen wurden bei verschiedenen Erkrankungen des Gefäßsystems gefunden, so z.B. bei stabilen und akuten Koronarerkrankungen (Michelson et al. 2001, Furman et al. 1998), bei Diabetes mellitus (Hu et al. 2004), Hypercholesterolemie (Tailor und Granger 2003) und atherothrombotischen Schlaganfall (Yamazaki et al. 2001).

CD62P gilt als mögliches Ziel einer Therapie, da Studien gezeigt haben, dass die Blockade von CD62P die endogene Fibrinolyse und arterielle Thrombolyse verstärkt (André 2004, Caron et al. 2002, Merten und Thiagarani 2000). Die Blockade von CD62P und der Degranulation wirkt möglicherweise auch antiinflammatorisch, antiproliferativ und antiatherogen (André 2004).

2.1.2 Physiologische und medikamentöse Inhibitoren der Plättchenfunktion

Physiologische Inhibitoren und Schutzfunktion des Endothels

Das funktionsfähige Endothel besitzt wichtige antithrombotische Eigenschaften. Es bildet eine Schutzschicht zwischen Plättchen und Gerinnungsfaktoren einerseits und der prothrombotisch und prokoagulatorisch wirkenden subendothelialen Matrix andererseits (Becker et al. 2000). Eine membranständige ADPase baut Plättchen-aktivierendes ADP zu Adenosin ab, welches einen Hemmstoff der Aktivierung darstellt. Weiterhin werden aus dem Endothel Prostaglandin I₂ (PGI₂) und Stickstoffmonoxid (NO) freigesetzt (Becker et al. 2000). PGI₂ verhindert über die Erhöhung des cAMP-Spiegels in den Plättchen deren Aktivierung. NO wirkt in ähnlicher Weise durch eine Erhöhung des cGMP-Spiegels. Abluminal sezerniertes NO und PGI₂ bewirken eine Vasorelaxation und hemmen die Proliferation glatter Muskelzellen. Daneben hat das Endothel auch gerinnungshemmende und fibrinolytische Aktivität (Becker et al. 2000).

Eine Endotheldysfunktion kann bedingt sein durch physikalische Schädigung, postischämischen Reperfusionsschaden und akute oder chronische Entzündungen (Becker et al. 2000) und kommt im Rahmen von Atherosklerose, akuten Koronarsyndromen, Diabetes mellitus, Präeklampsie, essentieller Hypertonie und thrombotischen Mikroangiopathien wie hämolytisch-urämischem Syndrom und thrombotisch-thrombozytopenischer Purpura vor (Alonso und Radomski 2003, Becker et al. 2000, Freedman und Loscalzo 2003). Nach koronarer Stent-Einlage wird eine prolongierte Endotheldysfunktion bis zu 6 Monaten beobachtet (Anderson 2003). Dysfunktionales Endothel hat eine verminderte antithrombotische Wirksamkeit und führt konsekutiv zu einer vermehrten Plättchenaktivierung und -adhäsion, daneben zur vermehrten Vasokonstriktion und Inflammation (Becker et al. 2000). Die Synthese von Tissue Faktor, Plättchen aktivierendem Faktor, vWF und PDGF ist gesteigert, während PGI₂ und NO vermindert sind (Becker et al. 2000).

Medikamentöse Inhibitoren und deren Einsatz in der Klinik

Anti-Plättchen-Wirkstoffe vermindern Aktivierung und/oder Aggregation der Plättchen (Rauch et al. 2001). Die am längsten bekannte und klinisch am weitesten verbreitete Substanz zur Plättchenfunktionshemmung stellt **Azetylsalizylsäure** (ASS) dar. ASS hemmt die Cyclooxygenase irreversibel und führt damit zu einer verringerten Synthese von TXA₂, welches von aktivierten Plättchen freigesetzt wird und einen Plättchen-aktivierenden Effekt aufweist. ASS führt damit v.a. zu einer verringerten Aktivierung und Aggregation (im Sinne einer Exzesshemmung) ohne jedoch die Aktivierung durch stärkere Agonisten wie Thrombin, ADP und Collagen vollständig hemmen zu können (Rauch et al. 2001). ASS wird eingesetzt zur Sekundärprophylaxe der koronaren Herzkrankheit und zerebraler Ischämien, sowie bei instabiler Angina pectoris, akutem Myokardinfarkt, perkutaner transluminaler koronarer Angioplastie (PTCA) und koronarer Stenteinlage. Nachteilig ist v.a. das erhöhte Risiko gastrointestinaler Ulzera und Blutungen. Verschiedene Studien haben gezeigt, dass ASS allein keine ausreichende Wirkung bei akuten kardiovaskulären Ereignissen und zu deren Sekundärprophylaxe erzielen kann (Rauch et al. 2001, Vorchheimer und Becker 2006).

Eine weitere klinisch etablierte Substanzgruppe stellen die **Thienopyridine** (Clopidogrel und der Vorgänger Ticlopidin) dar. Diese blockieren irreversibel P₂Y₁₂-Rezeptoren der Plättchen (Vorchheimer und Becker 2006, Caron et al. 2002). Sie verhindern somit die aktivierende Wirkung des ADP auf die Plättchen, welches aus aktivierten Plättchen freigesetzt wird und u.a. der Rekrutierung weiterer Plättchen in den wachsenden Thrombus dient. Sie unterbinden

damit einen wichtigen Verstärkungsweg und wirken daher auch bei anderen Auslösern der Aggregation als ADP (Rauch et al. 2001).

Die Thienopyridine sind effektive Medikamente und werden zur Sekundärprophylaxe von Myokardinfarkt, Schlaganfall und pAVK eingesetzt, in Kombination mit ASS zur Reokklusionsprophylaxe nach koronarer Stent-Einlage und bei akutem Koronarsyndrom ohne ST-Elevation. Die Thienopyridine sind Prodrugs, sie wirken nur in vivo. Wichtigste Nebenwirkung ist die Induktion einer Leukopenie oder Thrombopenie, wobei das Risiko bei Clopidogrel geringer ausgeprägt ist als bei Ticlopidin (Bertrand et al. 2000).

GPIIb/IIIa-Antagonisten: Vertreter sind Abciximab, Eptifibatid und Tirofiban. GPIIb/IIIa-Antagonisten blockieren die Fibrinogen-Rezeptoren der Plättchen (GPIIb/IIIa) und verhindern damit die Brückenbildung über Fibrinogen im Rahmen der Plättchenaggregation (Rauch et al. 2001). Damit kann die Aggregation unabhängig vom Auslöser unterdrückt werden.

GPIIb/IIIa-Antagonisten stellen die potentesten klinisch verfügbaren Hemmstoffe der Plättchenaggregation dar. GPIIb/IIIa-Antagonisten verhindern jedoch nicht die Aktivierung der Plättchen, sodass es zur Sekretion von Inhaltsstoffen, Exposition von CD62P und Abscheidung von Mikrovesikeln kommt (André 2004, Matzdorff et al. 2001, Caron et al. 2002, Klinkhardt et al. 2002).

Einsatzgebiete sind das akute Koronarsyndrom (instabile Angina pectoris/non-Q-wave-Infarkt) und perkutane Koronarinterventionen (Hochrisiko-PTCA) (Vorchheimer und Becker 2006). In der Langzeitanwendung haben sich GPIIb/IIIa-Antagonisten nicht bewährt (O'Neill et al. 2000). Nachteile der Substanzgruppe bestehen in erhöhtem Blutungsrisiko, v.a im Gebiet des arteriellen Zugangs und der Induktion einer Thrombopenie (Lefkovits et al. 1995, Topol et al. 2001).

Trotz wichtiger Verbesserungen in der Therapie der arteriellen Thrombose in den letzten Jahren können die derzeit verfügbaren Anti-Plättchen-Wirkstoffe die kurz- oder langfristige Progression der Atherosklerose oft nicht verhindern, da sie nicht wirksam genug sind oder zu kurz verabreicht werden. Daher besteht weiterhin ein Bedarf an neuen Substanzen, die sowohl die Thrombenbildung effektiv unterbinden können als auch das Blutungsrisiko nicht zu stark erhöhen, und die auch langfristig gegeben werden können (Rauch et al. 2001).

2.1.3 Erkrankungen mit Plättchenhyperreaktivität oder Endotheldysfunktion

Atherosklerose und arterielle Thrombose

Die ischämische Herzkrankheit ist die häufigste Todesursache weltweit. Bei generalisierter Atherosklerose sind 70% der Todesfälle durch einen akuten Myokardinfarkt bedingt, 10-17% durch einen Schlaganfall. Thromben, die sich auf atherosklerotischen Läsionen bilden, sind verantwortlich für Ischämie und Zunahme der Atherosklerose (Rauch et al. 2001).

Bei der arteriellen Thrombose dominieren Gefäßwandschäden in der Pathogenese, die zu einer verstärkten Plättchenadhäsion und -aggregation führen. Es entsteht ein so genannter weißer Thrombus, der zu 75% aus Plättchen besteht. Die Ruptur einer atherosklerotischen Plaque führt zur Freilegung von Auslösern der Plättchenaktivierung (Collagen) und Aktivierung der plasmatischen Gerinnung z.B. durch TF auf im Plaque akkumulierten Makrophagen (Rauch et al. 2001).

Diabetes mellitus

Plättchen von Patienten mit Diabetes mellitus sind reaktiver, exprimieren mehr Adhäsionsproteine und aggregieren bei geringeren Konzentrationen auslösender Substanzen. Folge ist ein erhöhter Verbrauch an Plättchen und längeres Verweilen der Plättchen an geschädigtem Endothel. Zusätzlich treten vermehrt Plättchen-Leukozyten-Konjugate bei Diabetes mellitus mit Vaskulopathie auf (Li et al. 2000, Rauch et al. 2001).

2.2 NO

2.2.1 NO-Wirkung

NO ist ein weit verbreiteter Botenstoff im Organismus. Es ist maßgeblich beteiligt an Signalvorgängen im Nervensystem, bei der Regulation des Tonus der glatten Muskulatur und der Plättchenaktivität.

Signaltransduktion

NO wird im Endothel durch die NO-Synthase gebildet, die L-Arginin und Sauerstoff zu L-Citrullin und NO umsetzt. Die NO-Synthase existiert in drei Isoformen: konstitutiv werden endotheliale (eNOS) und neuronale NO-Synthase exprimiert, die induzierbare NO-Synthase (iNOS) wird durch Zytokine und vasokonstriktive Substanzen induziert (Wallis 2005).

Die eNOS wird durch Scherkräfte aktiviert. Aus dem Endothel freigesetztes NO diffundiert in die Gefäßmuskelzellen und führt dort zu Vasodilatation und Proliferationshemmung. Luminal sezerniertes NO verhindert die Plättchenaggregation und Adhäsion von Leukozyten (Wallis

2005). In Plättchen gebildetes und freigesetztes NO verhindert die Rekrutierung von weiteren Plättchen in den wachsenden Thrombus (Freedman und Loscalzo 2003, Loscalzo 2001).

Im Plättchen aktiviert NO die Guanylatzyklase, die GTP zu cGMP umsetzt, welches nachgeschaltete Enzyme aktiviert. Letztendlich kommt es zu einem Abfall des zytosolischen Calciums und damit zur erschwerten Stimulierbarkeit des Plättchens, was sich u.a. in veringerten Zahl und Affinität der GPIIb/IIIa-Rezeptoren äußert (Wallis 2005).

Neben der Wirkung über cGMP sind bei verschiedenen NO-Donatoren auch cGMP-unabhängige Wirkungen bekannt oder werden vermutet, wie z.B. eine Hemmung der Cyclooxygenase-1 und der Phosphoinositid-3-Kinase (Loscalzo 2001) oder die Aktivierung von Calcium-ATPasen (Homer und Wanstall 2002).

Hämoglobin und NO

Die Interaktionen zwischen Hämoglobin und NO sind zur Zeit Gegenstand kontroverser Diskussionen.

NO wird durch Hämoglobin gebunden. Während die HWZ von NO in Erythrozyten-freier Lösung über 4 min beträgt, sinkt sie im Vollblut in den Bereich von unter 2 ms ab (Liu et al. 1998). Liegt Hämoglobin nicht intraerythrozytär, sondern in freier Form im Plasma vor, ist die Geschwindigkeit der Reaktion noch um den Faktor 600-1000 beschleunigt (Schechter und Gladwin 2003, Wallis 2005). Diese rasche Bindung von NO wird unter anderem verantwortlich gemacht für die starke Vasokonstriktion und arterielle Hypertonie bei einer intravaskulären Hämolyse (Schechter und Gladwin 2003). NO bindet rasch an Häm-Eisen unter Bildung von MetHämoglobin und Nitrat. Neben der Bildung von Methämoglobin finden vor allem bei hohen, pharmakologischen NO-Konzentrationen weitere Reaktionen zwischen NO und Hämoglobin statt: die Bildung von Eisen-Nitrosyl-Hämoglobin ohne Oxidation des Eisens und die Bildung von S-Nitroso-Hämoglobin durch Ankopplung an eine SH-Gruppe in β -cys-93-Position (Gow und Stamler 1998, Schechter und Gladwin 2003). Während die Bildung von Nitrat einem Abbau von NO gleichkommt, ist die Rolle der weiteren genannten Reaktionen umstritten. Möglicherweise kann NO auf diese Weise transportiert und wieder freigesetzt werden (Wallis 2005). Gow und Stamler (1998) stellten die kontroverse Theorie auf, dass NO durch Hämoglobin als β -cys93-nitrosyl-Hämoglobin konserviert wird, und an Orten niedriger Sauerstoffspannung wieder abgegeben werden kann.

2.2.2 Klinisch verwendete NO-Donatoren

Nitrate

Vertreter dieser am längsten verwendeten Gruppe sind Glyzeroltrinitrat (GTN), Isosorbitdinitrat (ISDN), Isosorbitmononitrat (ISMN) und Pentaerithrityltetranitrat (PETN).

Alle Substanzen wirken vorrangig über eine Gefäßerweiterung im venösen Stromgebiet.

GTN wird eingesetzt bei akuter Herzinsuffizienz und zur Anfallskoupierung und -prophylaxe bei Angina pectoris. Die anderen Substanzen werden zur Anfallsprophylaxe der Angina pectoris verwendet (Parker und Parker 1998, Wang et al. 2002).

Die Freisetzung von NO erfolgt unter Beteiligung von reduzierenden Substanzen, z.B. SH-Gruppen (z.B. Glutathion). In vivo werden Enzyme benötigt (Cytochrom P450, Glutathion-S-Transferase), da sonst die Reaktion zu langsam verlaufen würde. Ein generelles Problem stellt die Nitrattoleranz dar, die sich mit einem Wirkungsverlust nach 18-24-stündiger Dauergabe manifestiert. PETN weist eine geringere Tendenz zur Toleranzentwicklung auf als die anderen Nitrate (Wang et al. 2002).

Die Ursache der Nitrattoleranz ist nicht vollständig geklärt. Als mögliche Erklärungen der Nitrattoleranz werden diskutiert: Depletion von Sulfhydrylgruppen, Downregulation von Enzymen, die an der Bioaktivierung beteiligt sind, wie z.B. die mitochondriale Aldehyddehydrogenase, Desensitivierung der Guanylatzyklase, Veränderungen in der Rezeptordichte oder eine verstärkte vaskuläre Produktion von O_2^- , welches NO inaktiviert. (Wang et al. 2002, Yamamoto und Bing 2000, Münzel et al. 2005)

SNP

Eine weitere wichtige Substanz ist Natriumnitroprussid (SNP). Es besteht aus Eisen, das von 5 CN^- und 1 NO komplexiert wird. SNP wird klinisch selten eingesetzt zur Behandlung hypertensiver Krisen und ist einer der am stärksten wirksamen Gefäßdilatoren.

In Lösung befindliches SNP ist extrem photosensibel. NO wird freigesetzt durch Licht (in vitro) oder 1-Elektron-Reduktion. Die NO-Freisetzung wird durch Thiole verstärkt. In vivo scheint für die Freisetzung die Anwesenheit von Gewebefaktoren wichtig zu sein (Thiole, Hämproteine und eventuell Ascorbat). Die parallel auftretende Zyanidfreesetzung limitiert die Anwendung von SNP (Wang et al. 2002).

Sydnonimine

Wichtigster Vertreter dieser Gruppe ist Molsidomin. Es wird eingesetzt zur Prophylaxe der Angina pectoris. Molsidomin ist eine Vorstufe, welche durch enzymatische Hydrolyse zur

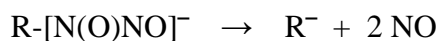
Wirksubstanz SIN-1 umgebaut wird. SIN-1 setzt NO spontan frei, verstärkt durch Thiole, Licht und $\text{pH} > 5$. Ein Vorteil des Molsidomins ist die fehlende Toleranzentwicklung. Problematisch bei SIN-1 ist, dass neben NO auch Superoxidanionen und Protonen freigesetzt werden, dadurch entsteht zum einen Wasserstoffperoxid, zum anderen Peroxynitrit und das Hydroxylradikal, das zur Lipidperoxidation führen kann (Wang et al. 2002).

2.2.3 Diazeniumdiolate

Als Diazeniumdiolate (oder NONOate) werden Substanzen bezeichnet, die die Struktur $[\text{N}(\text{O})\text{NO}]^-$ als funktionelle Gruppe enthalten.

Diazeniumdiolate stellen eine relativ neue und vielversprechende Gruppe von NO-Donatoren dar. Sie werden bisher nicht in der Klinik verwendet.

Diazeniumdiolate setzen bei physiologischem pH spontan NO frei, im Verhältnis 2 mol NO pro mol Diazeniumdiolat.



Sie benötigen dabei keine Aktivierung durch Enzyme oder Redoxvorgänge. Die Freisetzung des NO folgt einer Kinetik 1. Ordnung in Abhängigkeit vom pH-Wert, somit sind die Mengen an freigesetztem NO vorhersagbar (Fitzhugh und Keefer 2000). Diazeniumdiolate besitzen damit verschiedene Vorteile, die sie von anderen verfügbaren NO-Donatoren unterscheiden und die ihre Anwendung in Forschung und eventuell Klinik attraktiv machen (Fitzhugh und Keefer 2000):

1. Durch die Freisetzungskinetik 1.Ordnung sind NO-Konzentrationen vorhersagbar, im Gegensatz zu anderen NO-Donatoren, die aufgrund der beteiligten Bioaktivierung über komplizierte Kinetiken verfügen.
2. Die verschiedenen Substanzen der Gruppe decken eine weite Spanne von Halbwertszeiten im Bereich von 2s bis 20h ab.
3. Die NO-Freisetzung erfolgt spontan im physiologischen Milieu und ist nicht wie bei anderen verfügbaren NO-Donatoren von Redoxvorgängen abhängig. Dabei wird im Regelfall nur NO und nicht auch andere NO-Spezies freigesetzt, sodass tatsächlich der Effekt durch NO untersucht werden kann.
4. Diazeniumdiolate können bei Anwesenheit von Sauerstoffradikalen als Quelle von anderen NO-Spezies benutzt werden (z.B. Peroxynitrit, NO^- , NO_2).

Als mögliche klinische Anwendungen werden von verschiedenen Autoren vorgeschlagen: der Einsatz zur Vasodilatation bei pulmonalem Hochdruck und zur Beseitigung von Vasospasmen, zur Plättchenfunktionshemmung bei extrakorporaler Zirkulation zur Vermeidung von Plättchenverlusten. Weiterhin sind Diazeniumdiolate auch im Gespräch als Stentbeschichtung auf Koronarstents zur Verhinderung sowohl der akuten thrombogenen Restenosierung (durch kurzwirksame Diazeniumdiolate) als auch der späten Restenosierung durch Verhinderung der Proliferation glatter Muskelzellen (Fitzhugh und Keefer 2000, Keefer 2003).

2.2.4 Einsatz von NO-Donatoren zur Plättchenhemmung

Bisher werden NO-Donatoren nicht klinisch sondern nur experimentell - dabei hauptsächlich in vitro - zur Hemmung der Plättchenfunktion eingesetzt.

Die NO-Donatoren umfassen verschiedene Substanzgruppen u.a. Nitrate, S-Nitrosothiole wie S-Nitroso-Glutathion (GSNO) und Diazeniumdiolate.

Während Nitrate wie GTN bei sehr potenter vasodilatorischer Wirksamkeit nur eine geringe Hemmung der Plättchenfunktion erzielen (Wallis 2005), bewirken S-Nitrosothiole und Diazeniumdiolate in vitro sehr gute plättchenhemmende Effekte. Bei GSNO ist sogar die Wirkung auf Plättchen stärker ausgeprägt als die Wirkung auf die Gefäße (Wallis 2005, Alonso und Radomski 2003).

Die Gabe von NO-Donatoren zur Hemmung der Plättchenfunktion wäre ein elegantes Wirkprinzip, da ein wichtiger physiologischer Inhibitor imitiert wird, der bei Erkrankungen wie Atherosklerose und arterieller Thrombose vermindert ist.

Allerdings besteht bei allen NO-Donatoren das Problem der unsicheren Wirksamkeit bei Anwesenheit von Erythrozyten.

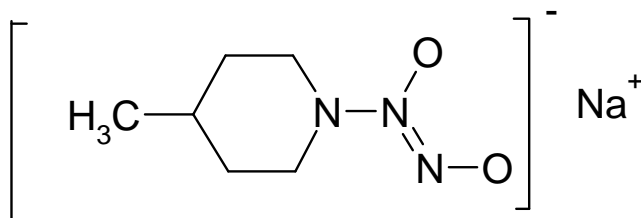
3. Zielsetzung

Bislang gibt es nur wenige Untersuchungen zur Wirkung von Diazeniumdiolaten auf die Plättchenaktivierung und zur Aufklärung des Wirkmechanismus. Es sollte daher die Wirkung eines Vertreters dieser Substanzgruppe Natrium-4-methyl-piperidyl-diazeniumdiolat (4-MEPI-NO) auf die Aktivierung von Plättchen in verschiedenen in-vitro-Systemen charakterisiert werden. 4-MEPI-NO wurde im Institut für Pharmazie der Universität Jena synthetisiert, die Strukturformel ist unten angegeben.

Es sollten vor allem untersucht werden:

- Wirksamkeit auf die Aggregation und verschiedene Parameter der Plättchenaktivierung wie Bildung von Mikro- und Makroaggregaten, CD62P-Expression und Interaktion von Plättchen mit Leukozyten
- Unterschiede der Wirkung in Ab- und Anwesenheit von Erythrozyten
- Dauer der Wirksamkeit in physiologischen Medien wie PRP und Vollblut im Vergleich zur physikalischen Halbwertszeit
- Bedeutung der Guanylatzyklase für die Hemmung von Plättchenfunktionen, mögliches Vorhandensein cGMP-unabhängiger Wirkungen

Natrium1-(4-methyl-1piperidyl)-diazen-1-ium-1,2-diolat



Molmasse: 180,2 g/mol

4. Material und Methoden

4.1. Material

4.1.1 Substanzen

Folgende Chemikalien, Fertiglösungen und Antikörper wurden verwendet:

ADP (Sigma)

anti-CD14-RPE (Biozol)

anti-CD42a-FITC (Becton Dickinson)

anti-CD42a-PE (Pharmingen)

anti-CD62P-PE (Becton Dickinson)

Cell Wash (Becton Dickinson)

Collagen (Kollagenreagens Horm, Nycomed)

Direct Cyclic GMP Enzyme Immunoassay Kit (Assay Designs)

DMSO (Sigma)

Eptifibatid (Integrilin®, Injektionslösung, ESSEX Pharma GmbH, 2mg/ml)

FACS Flow (Becton Dickinson)

FACS Lysing Solution (Becton Dickinson)

FlowCount Fluorospheres (Beckman Coulter)

Salzsäure 25% p.a. ISO (Carl Roth GmbH + CoKG)

IBMX (Sigma)

4-MEPI-NO (Institut für Pharmazie Jena)

Mouse gamma1 FITC (Becton Dickinson)

Mouse gamma1 PE (Becton Dickinson)

NaOH 99% p.a. (Carl Roth GmbH + CoKG)

Natriumcitrat-Dextrose-Lösung (Fresenius Home Care)

ODQ (Calbiochem)

SNP (Sigma)

4.1.2 Geräte

FACScan Durchflusszytometer (Becton Dickinson)

2-Kanal-Laseraggregometer LA 220 (Biola)

4-Kanal-Aggregometer PAP4C (BioData)

20G x 1½ Kanüle für S-Monovette (Sarstedt)

S-Monovette mit 1ml 0,106mol/l Trinatriumcitrat-Lösung (Sarstedt)

Thermomax microplate reader (Molecular devices)

Thermomixer comfort (Eppendorf)

Vortex-Genie 2 (Scientific Industries)

Zentrifuge Biofuge stratus (Heraeus instruments)

Zentrifuge Eppendorf 5402 (Eppendorf)

4.2 Methoden

4.2.1 Blutentnahme und Herstellung von plättchenreichem Plasma und plättchenarmem Plasma

Nach Vorliegen eines positiven Votums der Ethikkommission des Universitätsklinikums Jena wurden Blutproben von 25 gesunden freiwilligen Personen (12 männlich und 13 weiblich, Alter 22 - 53 Jahren) gewonnen. Die Blutspender waren über den Zweck der Studie informiert und versicherten, keine antithrombozytären, entzündlichen Medikamente oder Antibiotika in den letzten 14 Tagen eingenommen zu haben. Nach Punktion einer kubitalen Vene mit einer 20 Gauge Kanüle wurden mit 10ml-Monovetten 45 ml Blut entnommen und im Verhältnis 1:10 mit 0,106molarer Trisnatriumcitratlösung antikoaguliert. Die Blutentnahme erfolgte unter Vermeidung einer hohen Strömungsgeschwindigkeit, um Hämolyse und Plättchenaktivierung gering zu halten.

Das Blut wurde für 10 Minuten bei 240 x g zentrifugiert. Das plättchenreiche Plasma (PRP) wurde vorsichtig abpipettiert, in Polyethylenröhrchen bei Raumtemperatur aufbewahrt und innerhalb von 30 bis 90 Minuten nach Gewinnung verwendet. Zur Herstellung von plättchenarmem Plasma (PPP) wurde PRP 3 Minuten bei 5000 x g zentrifugiert und der Überstand abgenommen.

4.2.2 Gebrauchslösungen der Plättcheninhibitoren und -aktivatoren und anderer Testsubstanzen

SNP: Eine 0,01 M Stammlösung wurde täglich frisch durch Lösung der Substanz in Wasser hergestellt und so verdünnt, dass bei einem Verhältnis zwischen Inhibitor- und Probenvolumen (PRP oder Vollblut) von 1:50 Endkonzentrationen zwischen 100 µM und 0,05 µM erreicht wurden. In Kontrollansätzen wurde den Proben Wasser zugesetzt.

4-MEPI-NO: Eine 0,01 M Stammlösung wurde täglich frisch durch Lösung der Substanz in 1mM NaOH hergestellt und so verdünnt, dass bei einem Verhältnis zwischen Inhibitor- und Probenvolumen von 1:50 Endkonzentrationen zwischen 100 µM und 0,01 µM erreicht wurden. In Kontrollansätzen wurde den Proben 1 mM NaOH zugesetzt.

Eptifibatid: Die konfektionierte Lösung (2mg/ml) wurde bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und den Proben in einem Verhältnis von 1:2.000 zugesetzt, um eine Endkonzentration von 1 µg/ml zu erreichen.

Collagen: Die Collagen-Stammlösung (0,1 mg/ml) wurde bei -18°C gelagert und für jeden Versuch 1:4 mit Phosphat-gepufferter Kochsalzlösung (PBS) verdünnt, sodass bei einem Verhältnis von Collagenlösung zu Probe von 1:25 eine Endkonzentration von 10µg/ml erreicht wurde.

ADP: Eine 0,5 mM Stammlösung in PBS wurde bei -18°C gelagert und für jeden Versuch mit PBS so verdünnt, dass in den Proben bei einem Verhältnis von 1:25 Endkonzentrationen von 20 oder 1µM erreicht wurden.

ODQ, ein spezifischer Hemmstoff der Guanylatzyklase, und **IBMX**, ein Phosphodiesterase-Inhibitor, wurden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst (50 bzw. 250 mM Stammlösungen) und bei -18°C gelagert. Zu den Proben wurden sie in einem Verhältnis von 1:500 zugesetzt, sodass Endkonzentrationen von 0,1 mM ODQ und 0,5 mM IBMX erreicht wurden.

4.2.3 Inkubation von PRP und Vollblut mit 4-MEPI-NO oder SNP

Vor Aktivierung der Plättchen mit ADP oder Collagen wurden PRP- oder Vollblutproben mit 4-MEPI-NO oder SNP in unterschiedlichen Konzentrationen und für unterschiedlichen Zeiten bei Raumtemperatur inkubiert. Um eine Sedimentation der Zellen zu vermeiden, wurden die Proben in Abständen von 2 Minuten vorsichtig mit der Hand rotiert.

Um zu prüfen welche Rolle Plasmabestandteile für die Wirkung von 4-MEPI-NO auf die Plättchenaktivierung haben, wurden Plättchen aus 4-MEPI-NO-behandeltem PRP in frischem PPP resuspendiert und andererseits Plättchen aus unbehandelten PRP in 4-MEPI-NO-behandelten PPP resuspendiert. Für die Gewinnung von Plättchensedimenten für die Resuspension in PPP wurde PRP mit einem gleichen Volumen einer Natriumcitrat-Dextrose-Lösung gemischt, um durch die pH-Erniedrigung eine Aktivierung der Plättchen während der Zentrifugation für 5 Minuten bei 1.000 x g zu verhindern. Nach Dekantieren des Überstandes wurden die Plättchen in PPP vorsichtig resuspendiert und das Ausgangsvolumen der PRP-Probe wieder hergestellt.

4.2.4 Turbidimetrische Messung der Plättchenaggregation

Infolge der Aggregation nimmt im PRP die Lichtdurchlässigkeit zu. Dementsprechend kann durch kontinuierliche Aufzeichnung der Lichttransmission der zeitliche Verlauf einer

Plättchenaggregation aufgezeichnet werden (Born 1962). Für die durchgeführten Untersuchungen wurden ein Platelet Aggregation Profiler PAP4C mit 4 parallelen Messkanälen sowie ein 2-kanaliges Laser Aggregometer (LA220), das neben der Aggregation auch Veränderungen in der Größe der Aggregate aufzeichnet (Gabbasov et al. 1989), verwendet. Die Kalibrierung der Aggregation wurde mit PRP (0%) und PPP (100%) durchgeführt. Die Aggregatgröße wurde vom LA220 automatisch nach Einbringen der Probe auf den Wert 1 gesetzt und die Veränderungen als Vervielfachung aufgezeichnet. Während die Änderung der Lichttransmission durch die Bildung von großen, aus mehreren hundert Plättchen zusammengesetzten Aggregaten (Makroaggregate) bedingt ist, reflektiert die Zunahme der Partikelgröße die Bildung von Mikroaggregaten, die noch nicht zu einer Änderung der Lichttransmission führen (Gabbasov et al. 1989).

Vor Auslösen der Aggregation wurden die PRP-Proben (300 - 500 µl) in entsprechenden Küvetten für 3 Minuten auf 37°C erwärmt. Vor Zusatz von ADP oder Collagen wurde zunächst eine Basallinie für 1 Minute und dann die Aggregation solange aufgezeichnet, bis keine Änderung der Lichttransmission mehr sichtbar war (5 bis 10 Minuten). Während der Messung wurden die Proben mit einer Geschwindigkeit von 900 Umdrehungen/Minute mit einem Magnetrührer gerührt. Die Hemmung der Aggregation und die Zunahme der Aggregatgröße durch die Testsubstanzen wurde als prozentuale Hemmung im Vergleich zu Kontrollansätzen ohne Testsubstanzen berechnet.

4.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie wurde zur Bestimmung folgender Parameter eingesetzt:

- Aggregation im Vollblut und PRP
- Expression von CD62P auf der Plättchenoberfläche
- Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten

Die Durchflusszytometrie erlaubt durch Aufzeichnung der Vorwärts- und Seitwärtslichtstreuung eine Differenzierung von Zellen nach ihrer Größe und Granularität. Durch den Einsatz von Fluoreszenz-markierten Antikörpern, die gegen zellspezifische und/oder aktivierungsabhängige Oberflächenantigene gerichtet sind, können weitere Informationen gewonnen werden.

4.2.5.1 Aggregation im Vollblut und PRP

Bei dieser Methode werden die Plättchen anhand ihrer Streulichtcharakteristik sowie der Bindung eines anti-CD42a-Antikörpers, der gegen das Glykoprotein IX gerichtet ist, identifiziert und die Aggregation als Abnahme der Ereignisse im „Plättchen-Gate“ nach Aktivierung der Plättchen ermittelt (Fox et al. 2004). In Analogie zu den turbidimetrischen Messungen wurde die Aggregation durch Zusatz von 10 µg/ml Collagen zu den Proben (500 µl) ausgelöst und die Proben für 15 Minuten im Thermomixer (900 U/Minute; 37°C) inkubiert und anschließend durch Zugabe von 1 ml Cell Wash mit 1% Formaldehyd fixiert. Kontrollproben für die Bestimmung der initialen Plättchenzahl wurden ohne Inkubation fixiert.

Der FITC-markierte anti-CD42a-Antikörper wurde 1:10 mit Cell Wash verdünnt. 10 µl der Antikörperverschüttung wurden mit 10 µl der fixierten Vollblut- oder PRP-Proben gemischt und für 20 Minuten bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert. Unmittelbar vor der Messung wurden die Vollblutproben mit 1000 µl FACS Flow und die PRP-Proben mit 900 µl FACS Flow und 100 µl Flow Count Fluorospheres versetzt. Im Durchflusszytometer wurden bei den Vollblut- und PRP-Proben 50.000 Ereignisse akquiriert, die Anzahl der Ereignisse im Plättchen-Gate ausgewertet und auf die Erythrozytenzahl bzw. Anzahl der Flow Counts normiert. In Analogie zu der turbidimetrischen Messung der Aggregation wurde auch hier die Aggregation in % ermittelt.

4.2.5.2 Expression von CD62P auf der Plättchenoberfläche

Die CD62P-Expression wurde nach Inkubation von Vollblut oder PRP mit 10 µg/ml Collagen für 15 Minuten im Thermomixer (900 Bewegungen/Minute) bestimmt. Um eine Aggregation der Plättchen zu verhindern, wurde den Proben der GPIIb/IIIa-Antagonist Eptifibatid in einer Konzentration von 1 µg/ml zugesetzt.

200 µl Vollblut oder PRP wurden mit je 5 µl anti-CD42a-FITC und anti-CD62P-PE für 30 Minuten unter Lichtabschluss bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden zu jeder Probe 2 ml FACS Lysing Solution gegeben, um die Erythrozyten zu lysieren und die Zellen zu fixieren. Nach exakt 5 Minuten wurden 2 ml Cell Wash zupipettiert, die Proben 8 Minuten bei 350 x g zentrifugiert und die Überstände dekantiert. Die sedimentierten Zellen wurden durch Resuspension in 2 ml Cell Wash und nochmaliger Zentrifugation gewaschen und letztlich in 300 µl Cell Wash mit 1 % Formaldehyd aufgenommen. In Kontrollansätzen wurden anstelle der spezifischen Antikörper unspezifische Antikörper (IgG-FITC und IgG-PE) eingesetzt, um die unspezifische Bindung zu bestimmen.

Im Durchflusszytometer wurden bei logarithmischer Skalierung des Vorwärtsstreulichts 10.000 Ereignisse akquiriert und die Plättchen anhand ihrer Streulichtcharakteristik und der CD42a-Fluoreszenz identifiziert. Für die CD62P-Fluoreszenz wurde mittels des unspezifischen PE-markierten Antikörpers eine Schwelle definiert und der Prozentsatz der CD62P-positiven Plättchen (Plättchen mit einer PE-Fluoreszenz oberhalb der Schwelle) ermittelt.

4.2.5.3 Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten

Nach Inkubation von Vollblutproben mit 10 µg/ml Collagen für 15 Minuten im Thermomixer (900 Bewegungen/Minute) wurden 200 µl-Aliquots mit 3 µl anti-CD14-RPE und 5 µl anti-CD42a-FITC für 30 min bei 4°C unter Lichtabschluss inkubiert. Die Proben wurden dann in Analogie zur Bestimmung der CD62P-Expression aufgearbeitet.

Nach Akquisition von 5.000 Leukozyten bei linearer Skalierung des Vorwärtsstreulichts wurden die Granulozyten und Monozyten anhand ihrer Streulichtcharakteristika und der CD14-Fluoreszenz (Monozyten) identifiziert und hinsichtlich der Bindung des anti-CD42a-Antikörpers analysiert. CD42a-positive Granulozyten und Monozyten wurden als Konjugate angesehen und ihre Menge in Prozent der Gesamtzahl der jeweiligen Leukozyten-subpopulation angegeben. Die Schwelle für die CD42a-Fluoreszenz wurde mittels eines unspezifischen Antikörpers ermittelt (Redlich et al. 1997).

4.2.6 ELISA zur Bestimmung der cGMP-Spiegel

Die Experimente wurden bei 37°C im PRP durchgeführt. Zu allen Proben wurde der Phosphodiesterase-Hemmstoff IBMX in einer Konzentration von 0,5 mM dazugegeben und 10 min inkubiert. Anschließend wurde ODQ in einer Endkonzentration von 0,1 mM oder DMSO als Kontrolle zugegeben und weitere 10 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 4-MEPI-NO oder SNP (jeweils 10 µM). Nach 10 Minuten Inkubation wurde den Proben das gleiche Volumen 0,2 M Salzsäure zugesetzt, gemischt und bei 5000xg für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Im Überstand wurden die cGMP-Spiegel mit dem kommerziellen Set *Direct Cyclic GMP, Enzyme Immunoassay Kit* (Assay Designs, Inc, Ann Arbor, USA) entsprechend den Anweisungen der Hersteller in Doppelbestimmung bestimmt.

4.3 Statistik

Alle Werte sind, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die IC₅₀-Werte der einzelnen Dosis-Wirkungskurven (pro Proband) wurden nach Durchführung einer sigmoidaler Regression mit Hilfe des Computerprogramms Origin 7 bestimmt, die einzelnen IC₅₀-Werte wurden anschließend gemittelt.

Zur Auswertung der Daten und zur Erstellung der Abbildungen wurde Microsoft Excel verwendet. Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 13.0 durchgeführt.

Die Prüfung auf Normalverteilung erfolgte mit dem Shapiro-Wilk-Test. In den meisten Fällen lagen verbundene Stichproben vor. Bei vorhandener Normalverteilung wurde die Signifikanz mit dem gepaarten t-Test bestimmt. Lag keine Normalverteilung erfolgte die Bestimmung der Signifikanz mit dem Wilcoxon-Test, bei unverbundenen Stichproben mit dem Mann-Whitney-U-Test. Als Signifikanzschwelle wurde $p < 0,05$ festgelegt. Bei mehreren Testungen wurde die α -Adjustierung nach Holm durchgeführt.

Bei Dosis-Wirkungskurven, bei denen die Ermittlung von IC₅₀-Werten nicht möglich war, erfolgte die statistische Testung auf Wirkungsunterschiede unter der Annahme a priori geordneter Hypothesen. Dieses Verfahren kann beispielsweise bei Dosis-Wirkungs-Kurven angewendet werden. Voraussetzungen sind die Annahme eines monotonen Kurvenverlaufs und eine vorher festgelegte Reihenfolge der Testung, bei einer Dosis-Wirkungskurve nach absteigender Konzentration. Im Fall einer Dosis-Wirkungs-Kurve wird die Positivkontrolle zunächst gegen die größte Dosis getestet; liegt ein signifikanter Unterschied vor, wird die nächst kleinere Dosis gegen die Positivkontrolle getestet. Das Verfahren wird solange fortgesetzt bis erstmals kein signifikanter Unterschied mehr vorliegt. Die Einzeltestungen sind jeweils zu α signifikant (Hothorn und Lehmacher 1991). Dieses Verfahren wurde angewendet zum Nachweis von Wirkungsunterschieden bei den Versuchen zur Mikro- und Makroaggregation, zur Hemmung der CD62P-Expression im Vollblut und PRP und zum Vergleich der Hemmung der Aggregation im Vollblut und PRP.

5. Ergebnisse

5.1 Hemmung der Plättchenaggregation und Plättchenaktivierung

5.1.1 Hemmung der ADP- und Collagen-induzierten Aggregation im PRP durch 4-MEPI-NO im Vergleich zu SNP

Fragestellung Wie gut wirkt 4-MEPI-NO im PRP im Vergleich zu SNP? In welchem Bereich liegen die IC_{50} -Werte, wie groß ist die maximal erreichbare Hemmung der Aggregation und ergeben sich Änderungen bei Verlängerung der Inkubationszeit?

Durchführung PRP wurde 3, 6, 9 und 12 min lang bei Raumtemperatur mit 4-MEPI-NO oder SNP in Konzentrationen zwischen 100 und 0,05 μ M inkubiert. Danach wurde die Aggregation mit ADP (20 μ M) oder Collagen (10 μ g/ml) ausgelöst und im Aggregometer PAP4C aufgezeichnet. Eine Positivkontrolle mit jeweils nur ADP oder Collagen wurde bei jeder Messreihe mitgeführt.

Ergebnisse Zur Veranschaulichung sind mit dem PAP4C-Aggregometer aufgezeichnete typische Originalkurven in Abbildung 1a und 1b gezeigt. Sowohl ADP (20 μ M) als auch Collagen (10 μ g/ml) führen in den verwendeten Konzentrationen zu einer über 90%igen Aggregation. Die schmalen Zacken zu Beginn der einzelnen Kurven werden durch das Eintauchen der Pipette verursacht und markieren damit den Zeitpunkt der Zugabe von ADP oder Collagen. Erkennbar ist, dass bei Zugabe von ADP die Aggregation sofort einsetzt, während sie bei Collagen verzögert beginnt. Typischerweise verursacht Collagen die Bildung größerer Aggregate, was sich in größeren Amplitudenschwankungen der Aggregationskurve niederschlägt. 4-MEPI-NO in den verschiedenen Konzentrationen schwächt die Aggregation ab. Die Aggregation kann dabei zweizeitig verlaufen, wie in Abbildung 1a Kurve 3 zeigt.

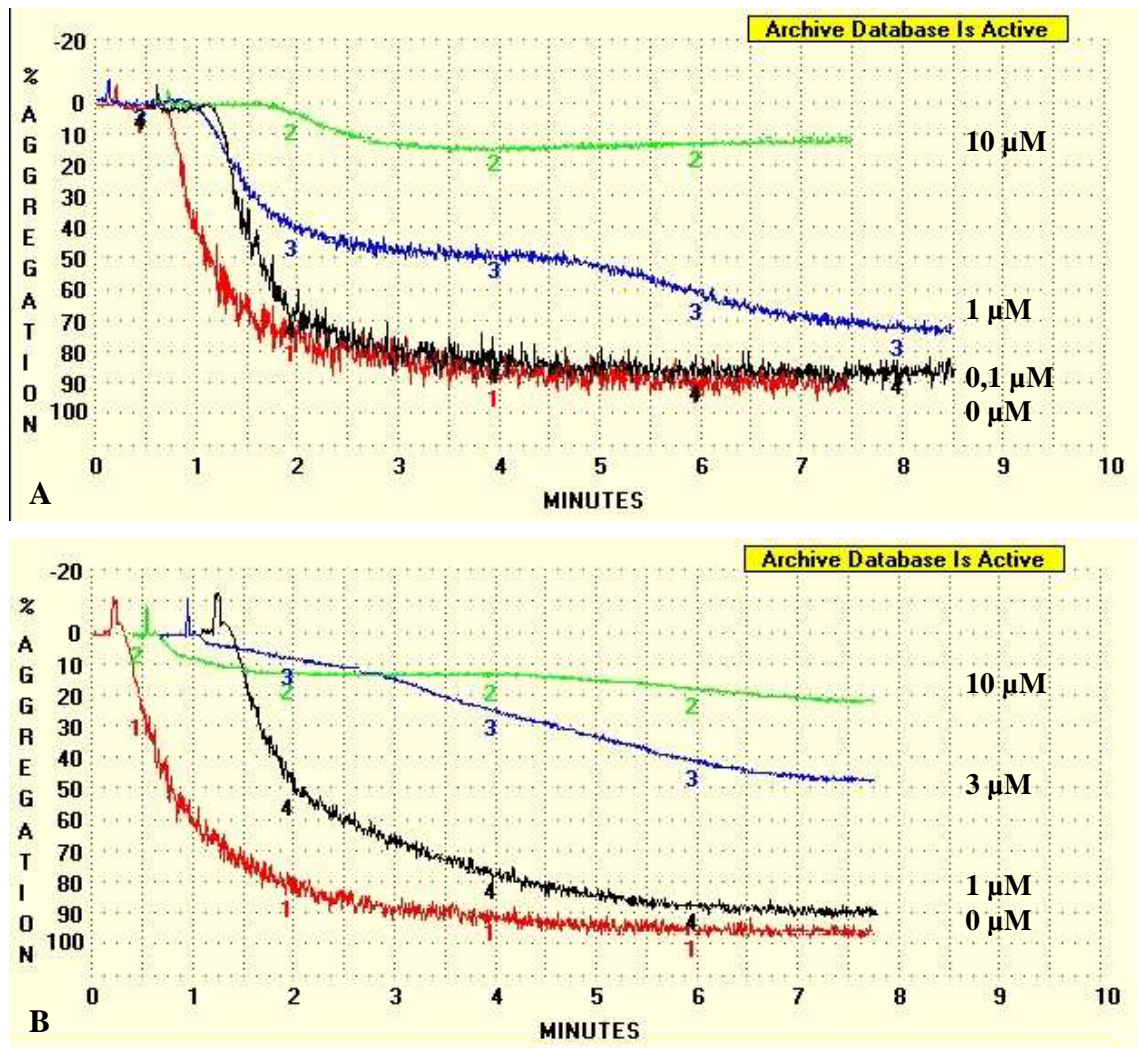


Abb. 1a + b Beispiel von Originalkurven der im PAP4C-Aggregometer aufgezeichneten Aggregation. Die Stimulation erfolgte mit 10 µg/ml Collagen (1a) bzw. 20 µM ADP (1b). Kurve 1 zeigt die Aggregation durch Collagen bzw. ADP (Positivkontrolle). Die Kurven 2 bis 4 zeigen den Einfluss von 4-MEPI-NO in verschiedenen Konzentrationen (10, 1, 0,1 µM in 1a und 10, 3, 1 µM in 1b) auf die Aggregation nach einer Inkubationszeit von 3 min (1a) bzw. 12 min (1b).

ADP-induzierte Aggregation

Die Wirkung von 4-MEPI-NO und SNP auf die ADP-induzierte Aggregation ist in Abbildung 2 dargestellt.

4-MEPI-NO: Die Dosis-Wirkungs-Kurven haben einen sigmoiden Verlauf. Bei einer Inkubationszeit von 3 min betrug die maximal erreichte Hemmung der Aggregation $87,1 \pm 10,0 \%$ bei einer Konzentration von 100 µM. Der IC_{50} -Wert lag bei einer Konzentration von $1,2 \pm 1,8 \mu M$. Bei Erhöhung der Inkubationszeit auf 6, 9 und 12 min änderten sich die IC_{50} -Werte und Maximalwerte der Hemmung nur unwesentlich. Insgesamt ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Inkubationszeiten.

SNP: Die Dosis-Wirkungskurven zeigen ebenfalls einen sigmoiden Verlauf. Bei einer Inkubationszeit von 3 min betrug die maximale Hemmung $89,2 \pm 2,0\%$ bei $30 \mu\text{M}$. Der IC_{50} -Wert lag bei $2,5 \pm 3,0 \mu\text{M}$. Die Steigerung der Inkubationszeit bewirkte keine wesentliche Änderung der maximal erreichten Hemmung. Die IC_{50} -Werte zeigten eine Tendenz bei längerer Inkubationszeit kleiner zu werden ($1,3 \pm 1,4 \mu\text{M}$ bei 6 min und $1,4 \pm 1,7 \mu\text{M}$ bei 9 min).

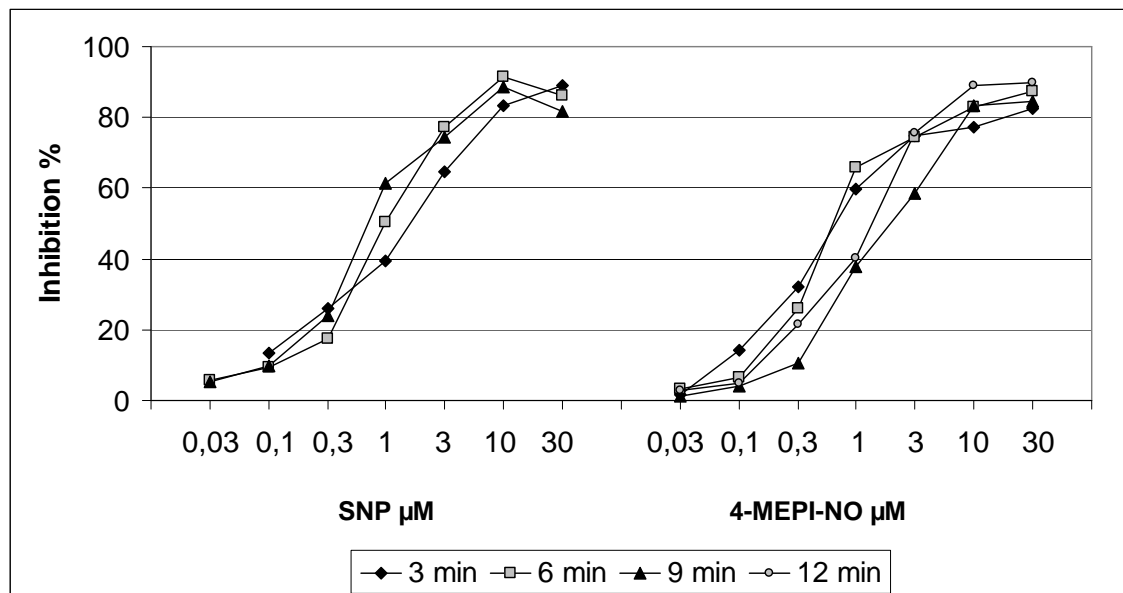


Abb.2 Hemmung der ADP (20 μM)-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO und SNP nach Inkubationszeiten von 3, 6, 9 und 12 min. Die Standardabweichungen liegen bei 4-MEPI-NO zwischen 3,2 und 32,5, bei SNP zwischen 2,0 und 33,0. $n = 4-7$.

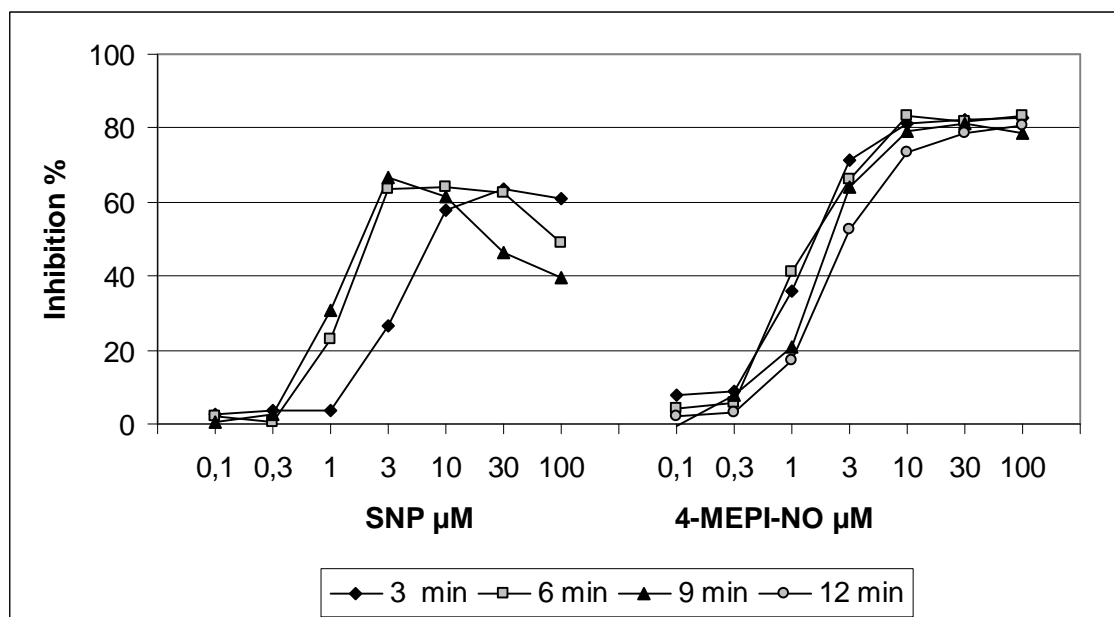


Abb.3 Hemmung der Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO und SNP nach Inkubationszeiten von 3, 6, 9 und 12 min. Die Standardabweichungen liegen bei 4-MEPI-NO zwischen 2,9 und 37,5, bei SNP zwischen 1,7 und 33,0. $n = 4-6$

Collagen-induzierte Aggregation

Abbildung 3 zeigt die Dosis-Wirkungskurven von 4-MEPI-NO und SNP auf die Collagen-induzierte Aggregation.

4-MEPI-NO: Die Dosis-Wirkungs-Kurven der Hemmung der Collagen-induzierten Aggregation zeigen ebenfalls einen sigmoiden Verlauf. Bei 3 min Inkubationszeit betrug die maximale Hemmung $82,9 \pm 11,1\%$ bei $100 \mu\text{M}$. Der IC_{50} -Wert lag bei $1,9 \pm 1,0 \mu\text{M}$. Eine Erhöhung der Inkubationszeit auf 6, 9 und 12 min führte zu keiner wesentlichen Änderung der maximal erreichten Hemmung. Die IC_{50} -Werte nahmen tendenziell etwas zu auf $4,3 \pm 3,4 \mu\text{M}$ bei 12 min Inkubationszeit.

SNP: Hier zeigten sich abweichende Verhältnisse. Bei einer Inkubationszeit von 3 min lag die maximale Hemmung der Aggregation nur bei $63,4 \pm 21,6 \%$. Der IC_{50} -Wert lag bei $12,1 \pm 4,3 \mu\text{M}$ und war damit im Vergleich zu 4-MEPI-NO signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Bei Erhöhung der Inkubationszeit auf 6 und 9 min zeigte sich, dass einerseits der IC_{50} -Wert abnahm ($1,8 \pm 1,1 \mu\text{M}$ bei 6 min und $1,6 \pm 1,0 \mu\text{M}$ bei 9 min, $p < 0,05$ bei 3 versus 6 oder 9 min), also die Wirkung von SNP sich verbesserte, andererseits kam es nun zu einer Abnahme der Wirkung bei hohen Konzentrationen, wobei dieser Effekt bei 9 min Inkubationszeit stärker ausgeprägt war als bei 6 min. Der Wert der maximalen Hemmung erhöhte sich bei längeren Inkubationszeiten von 6 und 9 min nur unwesentlich ($63,9 \pm 25,9 \%$ und $66,8 \pm 20,5 \%$). Je ein Proband pro Gruppe hatte keine 50%ige Hemmung erreicht und ging nicht in die Berechnung mit ein. Die IC_{50} -Werte sind also etwas höher anzusetzen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sowohl die Collagen- als auch die ADP-induzierte Aggregation durch 4-MEPI-NO etwa zwischen 80 und 90% gehemmt wurde. Die ADP-induzierte Aggregation konnte mit einer knapp 90%igen Hemmung tendenziell besser gehemmt werden als die Collagen-induzierte Aggregation mit etwa 80%. Es war keine signifikante Zeitabhängigkeit der Wirkung zu verzeichnen.

SNP zeigte eine vergleichbar gute Hemmung der ADP-induzierten Aggregation wie 4-MEPI-NO, während die Collagen-induzierte Aggregation durch 4-MEPI-NO deutlich besser gehemmt wurde.

Die IC_{50} -Werte der Dosis-Wirkungskurven von 4-MEPI-NO und SNP bei unterschiedlichen Inkubationszeiten sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Tab.1 Zusammenstellung der IC₅₀-Werte der Dosis-Wirkungskurven der Hemmung der ADP (20 µM)- oder Collagen (10 µg/ml)-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO und SNP bei verschiedenen Inkubationszeiten. Angegeben sind die Mittelwerte ± Standardabweichung. n = 4-7

	ADP-induzierte Aggregation		Collagen-induzierte Aggregation	
	4-MEPI-NO	SNP	4-MEPI-NO	SNP
3 min	1,2 ± 1,8 µM	2,5 ± 3,0 µM	1,9 ± 1,0 µM	12,1 ± 4,3 µM
6 min	1,1 ± 1,4 µM	1,3 ± 1,4 µM	1,9 ± 1,2 µM	1,8 ± 1,1 µM
9 min	1,9 ± 1,5 µM	1,4 ± 1,7 µM	2,5 ± 1,3 µM	1,6 ± 1,0 µM
12 min	1,4 ± 1,1 µM		4,3 ± 3,4 µM	

5.1.2 Hemmung der Mikro- und Makroaggregatbildung im PRP

Fragestellung Verschiedene Anti-Plättchen-Wirkstoffe weisen eine schwächere Wirksamkeit auf die Mikroaggregatbildung im Vergleich zur Makroaggregatbildung auf. Sind diese Unterschiede auch bei 4-MEPI-NO nachweisbar?

Durchführung PRP wurde 5 min mit 4-MEPI-NO inkubiert und dann mit 1µM ADP stimuliert. Die Aggregation wurde mit dem Laseraggregometer LA 220 bestimmt, welches die parallele Aufzeichnung von Veränderungen der Lichttransmission und der Aggregatgröße ermöglicht.

Bei der Hemmung der Makroaggregatbildung wurde bei einem Teil der Probanden die 50% Marke der Hemmung nicht unterschritten. Daher war für die einzelnen Dosis-Wirkungskurven keine Berechnung und kein Vergleich der IC₅₀-Werte möglich. Zum Nachweis der Wirkungsunterschiede siehe Methodik S. 27.

Ergebnisse Zur Veranschaulichung sind zwei Originalkurven in Abbildung 4 gezeigt. Die Reaktion wurde über 5 Minuten aufgezeichnet. Die Änderung der Lichttransmission diente als Maß der Makroaggregation, die Änderung der Aggregatgröße als Maß der Mikroaggregation. Die Originalkurven zeigen, dass stark ausgeprägte Veränderungen der Aggregatgröße von einer Zunahme der Lichttransmission begleitet sind (4a). Geringere Veränderungen der Aggregatgröße schlagen sich jedoch nicht in deutlichen Veränderungen der Lichttransmission nieder (4b).

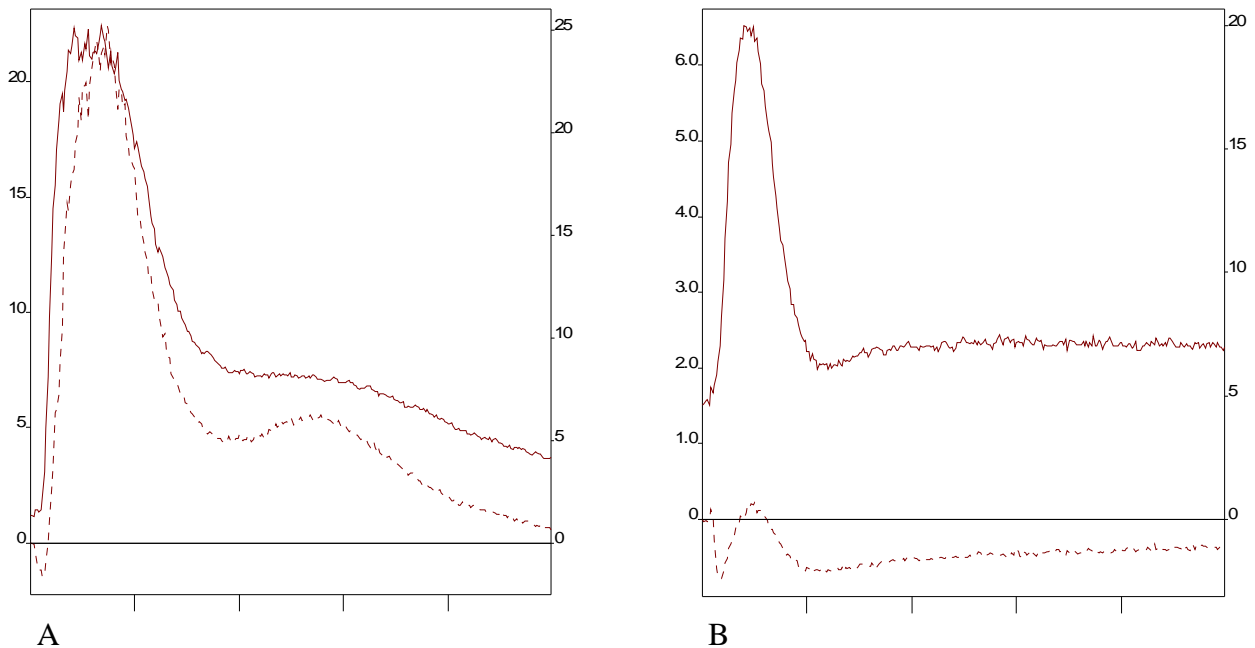


Abb.4 Änderung der Lichttransmission (unterbrochene Linie) und Aggregatgröße (durchgezogene Linie) nach Stimulation mit 1 μM ADP ohne 4-MEPI-NO (A) und mit 0,1 μM 4-MEPI-NO (B). Die x-Achse stellt die Zeit (min) dar, die linke y-Achse zeigt die relative Aggregatgröße, die rechte y-Achse zeigt die Zunahme der Lichttransmission in % (Maß für die Makroaggregation).

(A) Nach Stimulation mit 1 μM ADP steigt die Aggregatgröße reversibel auf die etwa 22fache Größe an, die Lichttransmission nimmt reversibel um etwa 25% zu.

(B) Nach 5-minütiger Vorinkubation mit 0,1 μM 4-MEPI-NO führt die ADP-Stimulation zu einer 6fachen reversiblen Vergrößerung der Aggregate. Die Aggregate bleiben dann konstant bei etwa der 2fachen Größe. Die Änderung der Lichttransmission schwankt um 0 und stellt sich auf etwa -1% ein.

Das Verhalten der **Mikroaggregatbildung**, gemessen anhand der relativen Aggregatgröße, in Abhängigkeit von der 4-MEPI-NO-Konzentration ist in Abbildung 5 dargestellt. Durch Stimulation mit 1 μM ADP kam es zu einer Vergrößerung der Partikelgröße etwa auf die 20-fache Größe. Bei vorheriger Inkubation mit 30 μM 4-MEPI-NO kam es zu einer durchschnittlichen Vergrößerung auf die 1,7-fache relative Größe ($p < 0,05$). Das entspricht einer Hemmung der ADP-Wirkung von $91,6 \pm 3,5\%$. Die erreichte Hemmung sank dann mit abnehmender 4-MEPI-NO-Konzentration ab bis zu einer noch signifikanten Hemmung von $53,8 \pm 37,1\%$ bei 0,3 μM ($p < 0,05$). Bei 0,1 μM war noch eine tendenzielle Hemmung von $14,1 \pm 40,6\%$ feststellbar. Der IC_{50} -Wert der Hemmung lag bei $0,27 \pm 0,23 \mu\text{M}$.

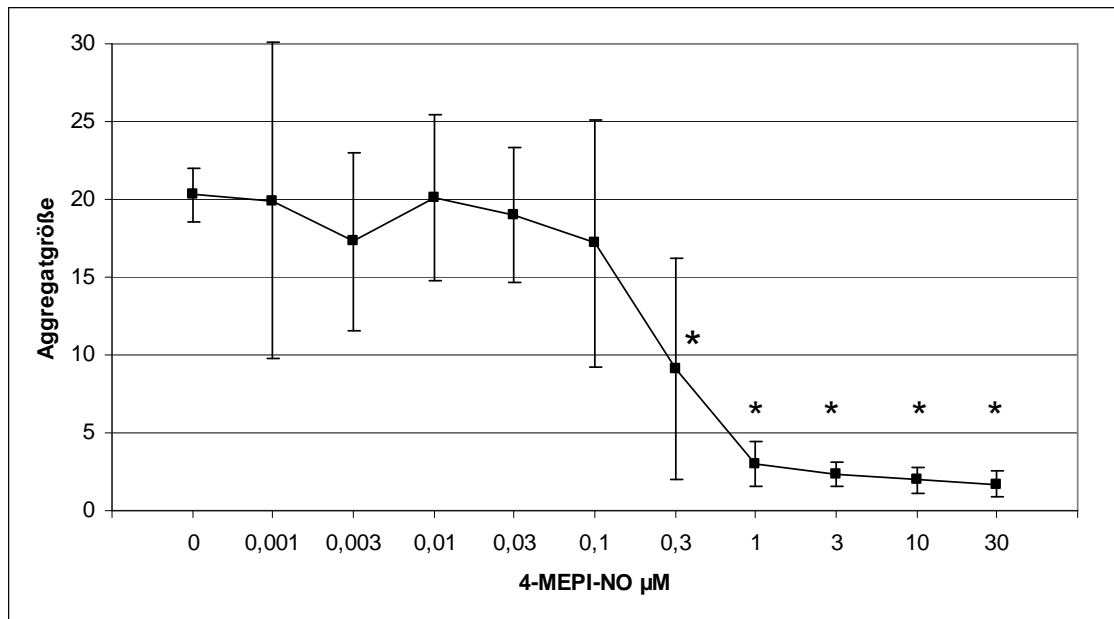


Abb.5 Konzentrationsabhängiger Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Mikroaggregatbildung ausgelöst durch $1\mu\text{M}$ ADP, gemessen anhand der relativen maximalen Aggregatgröße. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der Positivkontrolle ($0\mu\text{M}$ 4-MEPI-NO) und den jeweiligen 4-MEPI-NO-Konzentrationen. $n = 4-7$. * $p < 0,05$

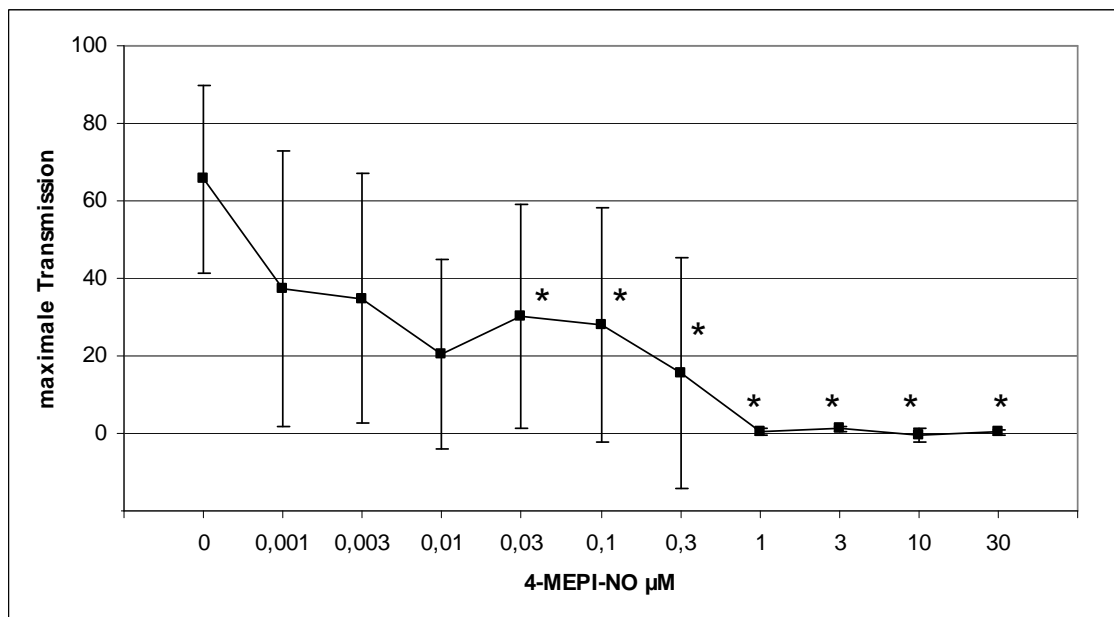


Abb.6 Konzentrationsabhängiger Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Makroaggregatbildung durch $1\mu\text{M}$ ADP. Dargestellt sind die Mittelwerte der maximalen Transmission (in %) \pm Standardabweichung. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen der Positivkontrolle ($0\mu\text{M}$ 4-MEPI-NO) und den jeweiligen 4-MEPI-NO-Konzentrationen. $n = 4-7$. * $p < 0,05$

Der Einfluss von 4-MEPI-NO auf die **Makroaggregation**, gemessen mittels Veränderung der Lichttransmission, ist in Abbildung 6 dargestellt. $1\mu\text{M}$ ADP verursachte eine Aggregation von $65,6 \pm 24,3\%$. 4-MEPI-NO inhibierte die ADP-Wirkung maximal um $99,3 \pm 0,4\%$ bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$. Der Effekt der 4-MEPI-NO-Wirkung im Vergleich zur

Positivkontrolle blieb bis zu einer Konzentration von 0,03 μM signifikant ($p < 0,05$) nachweisbar. Die Dosis-Wirkungskurven der Hemmung der Mikro- und Makroaggregatbildung durch 4-MEPI-NO sind in Abbildung 7 dargestellt.

Zusammenfassend reagiert die Mikroaggregation mindestens um den Faktor 10 weniger empfindlich als die Makroaggregation auf 4-MEPI-NO. Die maximal erreichte Hemmung der Mikroaggregation war um etwa 10% geringer als die maximale Hemmung der Makroaggregation. Eine Vergrößerung auf die 1,7fache Größe der Aggregate konnte auch durch hohe Konzentrationen von 4-MEPI-NO nicht unterdrückt werden.

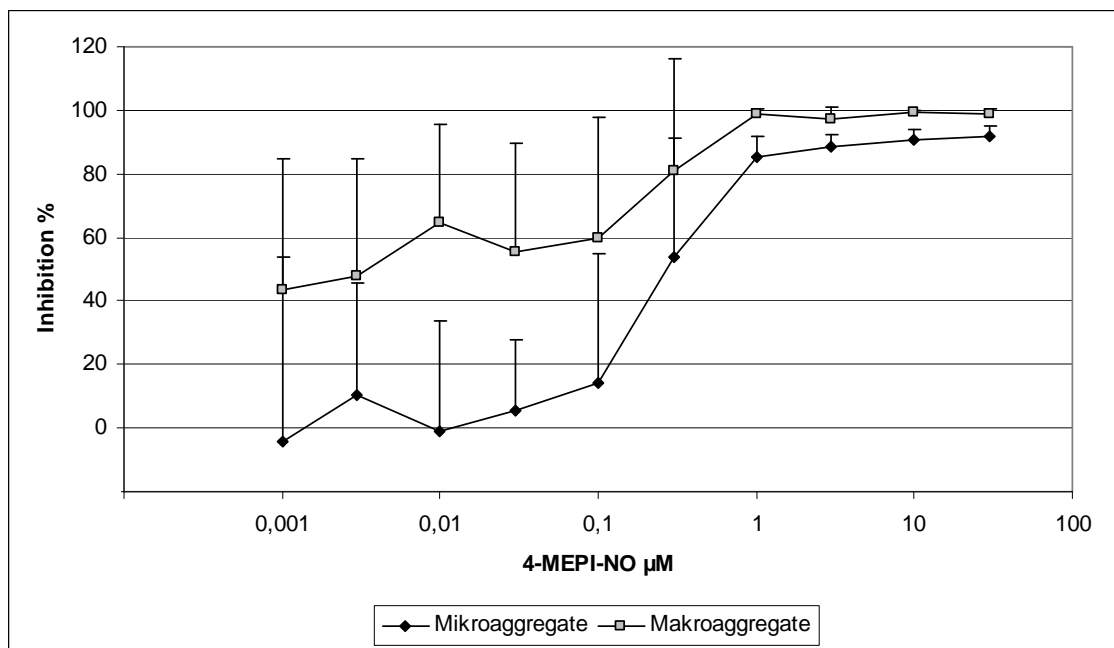


Abb.7 Hemmung der Mikro- und Makroaggregatbildung durch 4-MEPI-NO nach Stimulation mit 1 μM ADP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. $n = 4-7$

5.1.3 Vergleichende Messung der Hemmung der Aggregation im Vollblut und im PRP

Durchführung PRP und Vollblut wurden 10 min mit 4-MEPI-NO bei 37°C inkubiert, dann mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Collagen stimuliert und 15 min im Thermomixer bei 37°C und 900 U/min inkubiert. Dann wurden die Ansätze mit Formaldehyd fixiert und die Plättchenzahl mittels Durchflusszytometrie bestimmt. Pro Proband wurde parallel die Hemmung der Aggregation im Vollblut und PRP mittels Durchflusszytometrie sowie die Hemmung der Aggregation im PRP mittels PAP4C-Aggregometer bestimmt.

Ergebnisse Der Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Collagen-induzierte Aggregation im Vollblut und im PRP ist in Abbildung 8 dargestellt. Abbildung 9 zeigt die Dosis-Wirkungskurven der Hemmung der Aggregation im Vollblut und PRP.

Collagen führte im PRP und im Vollblut zu einer etwa 90%igen Aggregation. Die Aggregation im Vollblut war nur bei 100 μM 4-MEPI-NO im Vergleich zur Positivkontrolle gering aber signifikant ($p < 0,05$) gemindert, von im Mittel $89,9 \pm 14,3\%$ auf $85 \pm 18,0\%$ Aggregation. Das entspricht einer Hemmung der Aggregation von $6,3 \pm 6,7\%$.

Im PRP waren die Aggregationswerte bei 100 μM , 30 μM und 10 μM signifikant verschieden von der Positivkontrolle (100 μM $p < 0,01$, 30 μM und 10 μM $p < 0,05$), bei 3 μM war noch eine deutliche Tendenz zur Hemmung der Aggregation zu erkennen. Die maximal erreichte Hemmung der Aggregation bei 100 μM betrug $96,9 \pm 35,7\%$. Der IC_{50} -Wert lag bei $23,2 \pm 33,9 \mu\text{M}$.

Im Vollblut ließ sich bei den angewandten 4-MEPI-NO-Konzentrationen keine relevante Hemmung der Aggregation feststellen, bei guter Hemmung im PRP. Die Restwirkung bei 100 μM 4-MEPI-NO weist darauf hin, dass eventuell bei noch höheren Konzentrationen von 4-MEPI-NO auch im Vollblut eine Wirkung zu erreichen sein könnte.

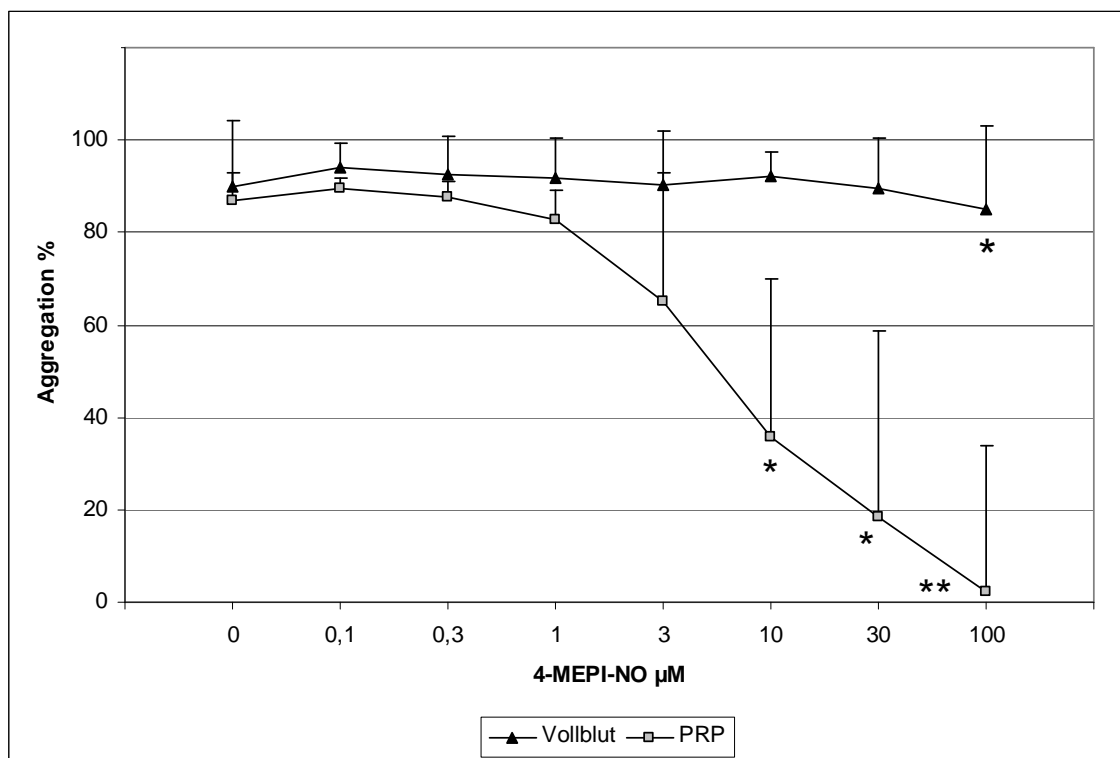


Abb.8 Konzentrationsabhängiger Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)-induzierte Aggregation im Vollblut und im PRP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen den Positivkontrollen (0 μM 4-MEPI-NO) und den jeweiligen 4-MEPI-NO-Konzentrationen. $n = 5$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

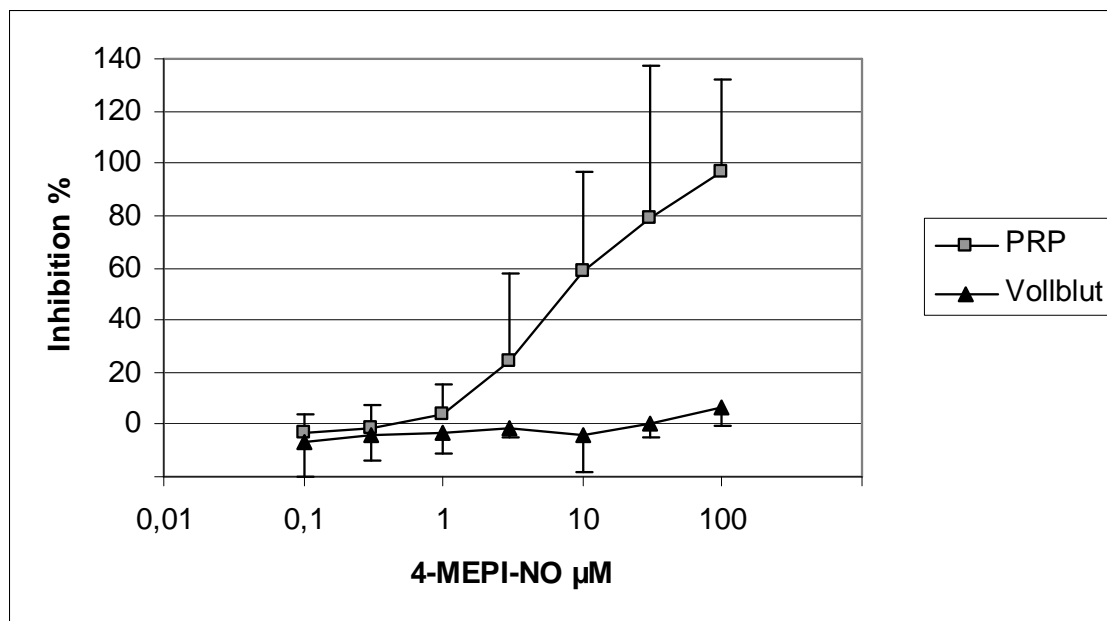


Abb.9 Hemmung der Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO im Vollblut und im PRP. Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung. n = 5.

5.1.4 Vergleich der Messung der Aggregation im PRP mittels PAP4C und Durchflussszytometrie

Fragestellung Sind Ergebnisse bezüglich der Aggregationshemmung, die durch PAP4C oder Durchflussszytometrie gewonnen wurden, vergleichbar?

Die Durchführung ist unter 5.1.3. beschrieben. Pro Proband wurde parallel die Hemmung der Aggregation im PRP mittels Durchflussszytometrie und Aggregometer PAP4C bestimmt.

Ergebnisse In Abbildung 10 sind die Dosis-Wirkungskurve der Hemmung der Aggregation im PRP dargestellt, welche mit Durchflussszytometer und Aggregometer bestimmt wurden. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Kurven der Mittelwerte zeigten Unterschiede im Bereich der Maximalwerte 100 μM und 30 μM , wobei mit dem Durchflussszytometer die maximale Hemmung im Mittel etwa 97% betrug, während mit dem PAP4C eine maximale Hemmung von 78% gemessen wurde. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Die unteren Bereiche der Kurven und die IC-50-Werte zeigten fast identische Werte (IC₅₀: PAP4C 21,1 \pm 20,5 μM , Durchflussszytometer 23,2 \pm 33,9 μM). Bei der Messung mit dem Durchflussszytometer zeigte sich eine größere Standardabweichung bei den hohen 4-MEPI-NO-Konzentrationen (30 μM und 100 μM), die etwa das 2,5 fache der Standardabweichung der Werte betrug, die mit dem PAP4C bestimmt wurden. Im Gegensatz

zum Aggregometer PAP4C wurden bei Einzelmessungen im Durchflusszytometer auch Inhibitionswerte von über 100% bestimmt.

Wenn es um die Bestimmung der IC-50-Werte geht - meist die relevante Fragestellung-, kommen beide Methoden zu vergleichbaren Ergebnissen.

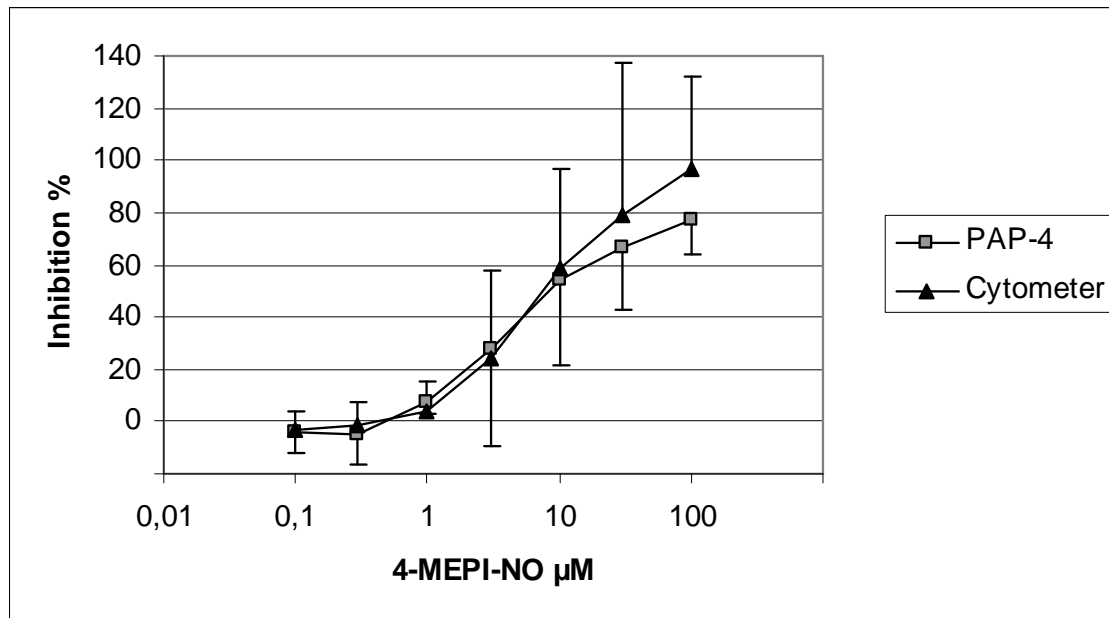


Abb.10 Hemmung der Collagen-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO im PRP. Vergleich der mit Aggregometer und Durchflusszytometer gewonnenen Messergebnisse. Darstellung der Mittelwerte \pm Standardabweichung. n = 5

5.1.5 Hemmung der CD62P-Expression im Vollblut und PRP und Hemmung der Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten

Fragestellung CD62P ist ein Marker der Plättchenaktivierung und vermittelt die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten. Es ist bekannt, dass NO in inhalierter Form und bei niedrigen Konzentrationen von Agonisten die CD62P-Expression in vivo hemmt. Es sollte jetzt untersucht werden, ob auch bei hohen Collagenkonzentrationen mit der Substanz 4-MEPI-NO die CD62P-Expression und Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten gehemmt werden kann. Bei paralleler Messung der Aggregation sollte die Empfindlichkeit der CD62P-Expression und der Aggregation verglichen werden.

Durchführung Um die Plättchenaggregation zu verhindern, wurde dem Vollblut unmittelbar nach der Entnahme Eptifibatid (1,0 $\mu\text{g/ml}$) zugesetzt. Vollblut oder PRP wurden bei 37°C 10 Minuten mit 4-MEPI-NO (100 μM bis 1 μM) oder dessen Vehikel inkubiert. Die Aktivierung

wurde mit Collagen (10 µg/ml) ausgelöst und 15 min im Thermomixer bei 37°C und 900 U/min inkubiert. Dabei wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle ohne 4-MEPI-NO und ohne Collagen und eine Positiv-Kontrolle ohne 4-MEPI-NO und mit Collagen mitgeführt. Parallel wurde die Hemmung der Aggregation im Aggregometer PAP4C bestimmt.

Ergebnisse Der Einfluss von 4-MEPI-NO auf die CD62P-Expression im Vollblut und im PRP ist in Abbildung 11 dargestellt, die entsprechenden Dosis-Wirkungskurven der Hemmung in Abbildung 12.

CD62P-Expression im Vollblut: Collagen ließ die Zahl der CD62P-positiven Plättchen deutlich ansteigen, von $9,1 \pm 3,0\%$ auf $69,4 \pm 19,1\%$. ($p < 0,005$).

100 µM 4-MEPI-NO verminderten die Zahl der CD62P-positiven Plättchen im Vergleich zur Positivkontrolle signifikant ($p < 0,05$) auf $56,9 \pm 22,5\%$. Das entspricht einer Hemmung der CD62P-Expression von $18,2 \pm 14,3\%$. Bei 30 µM 4-MEPI-NO war tendenziell noch eine Verminderung der Anzahl der CD62P-positiven Plättchen zu erkennen.

CD62P-Expression im PRP: Durch Collagen kam es zu einem deutlichen Anstieg der CD62P-Expression von $7,2 \pm 1,8\%$ auf $52,4 \pm 18,3\%$ ($p < 0,01$). Im Vollblut war damit im Vergleich zum PRP ein etwa 1,3-fach höherer Anstieg der CD62P-Expression nach Collagenstimulation zu verzeichnen (nicht signifikant). 4-MEPI-NO inhibierte die Collagen-induzierte CD62P-Expression, eine signifikante Hemmung (im Vergleich zur Positivkontrolle) war bei 4-MEPI-NO-Konzentrationen bis zu 1 µM zu beobachten ($p < 0,05$). Die maximale Hemmung der CD62P-Expression betrug $94,3 \pm 3,1\%$ bei 30µM 4-MEPI-NO. Der IC₅₀-Wert der Hemmung der CD62P-Expression betrug im Mittel $0,8 \pm 0,5\mu\text{M}$. Bei der gleichzeitig im Aggregometer bestimmten Hemmung der Aggregation zeigte sich eine maximale Hemmung der Aggregation bei 100 µM 4-MEPI-NO von $87,7 \pm 6,5\%$ und ein IC₅₀-Wert von $7,4 \pm 3,4\mu\text{M}$. Die CD62P-Expression reagierte also etwa um den Faktor 10 empfindlicher auf die Anwesenheit von 4-MEPI-NO als die Aggregation ($p < 0,05$). Die Dosis-Wirkungskurven der Hemmung der Aggregation und der CD62P-Expression sind vergleichend in Abbildung 13 gezeigt. Im Vergleich zu den Ergebnissen der zeitlich früher durchgeführten Versuche unter 5.1.1 fiel bei der Hemmung der Aggregation ein deutlich höherer IC₅₀-Wert auf.

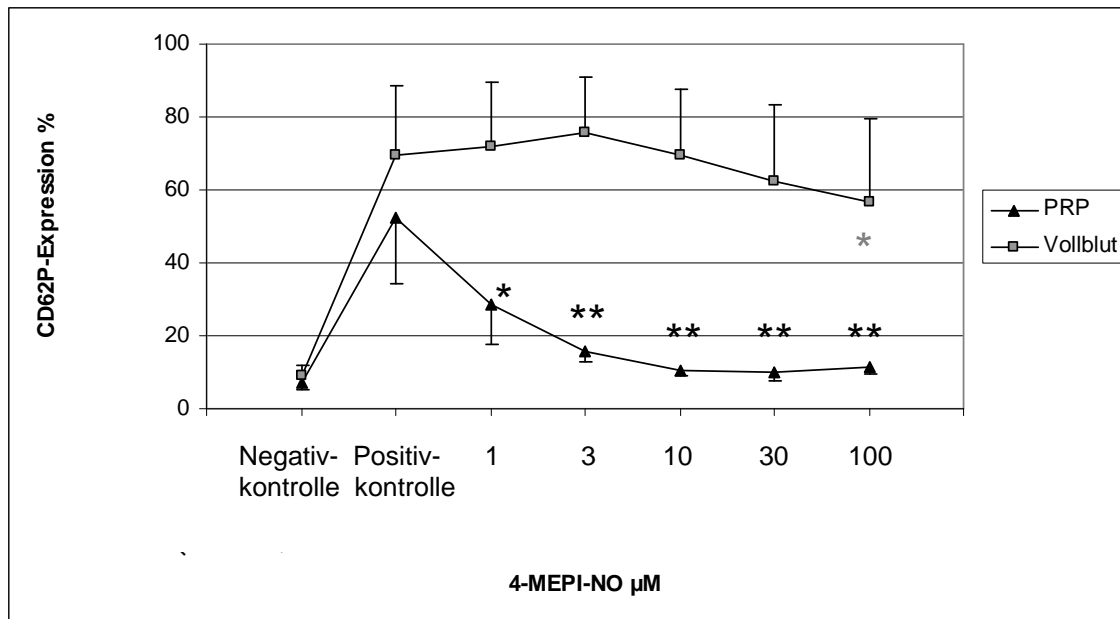


Abb.11 Konzentrationsabhängiger Einfluss von 4-MEPI-NO auf die CD62P-Expression nach Collagen-Stimulation (10 $\mu\text{g/ml}$) im Vollblut und im PRP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebenen Signifikanzen beziehen sich auf den Vergleich zwischen Positivkontrolle und den Werten bei den jeweiligen 4-MEPI-NO-Konzentrationen. n = 5-6. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$

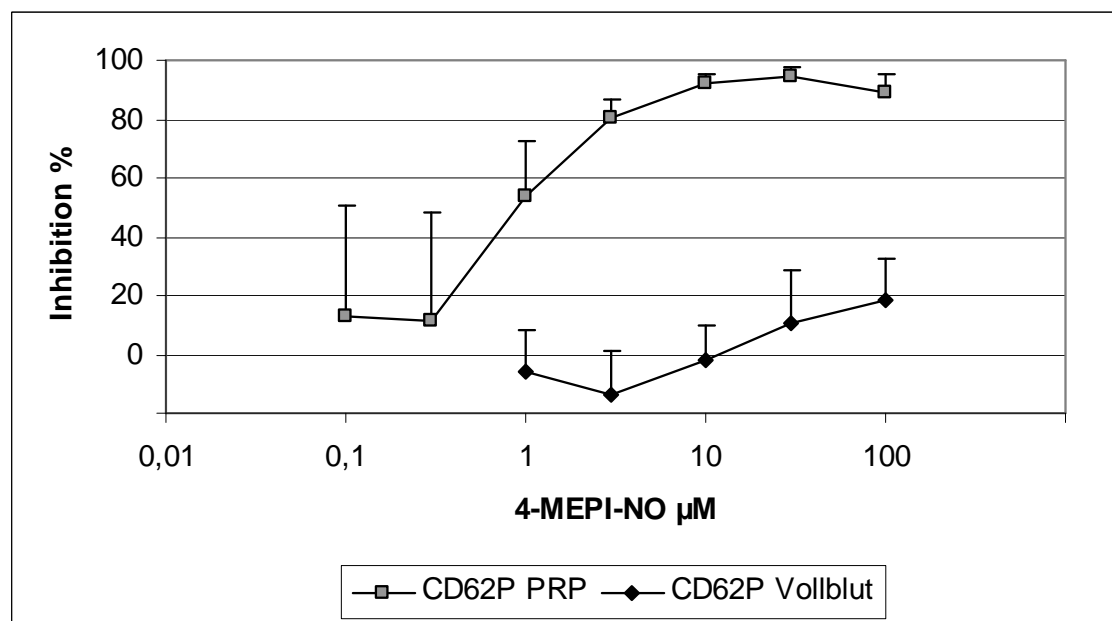


Abb.12 Hemmung der Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)-induzierten CD62P-Expression durch 4-MEPI-NO im Vollblut und PRP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. n = 5-6

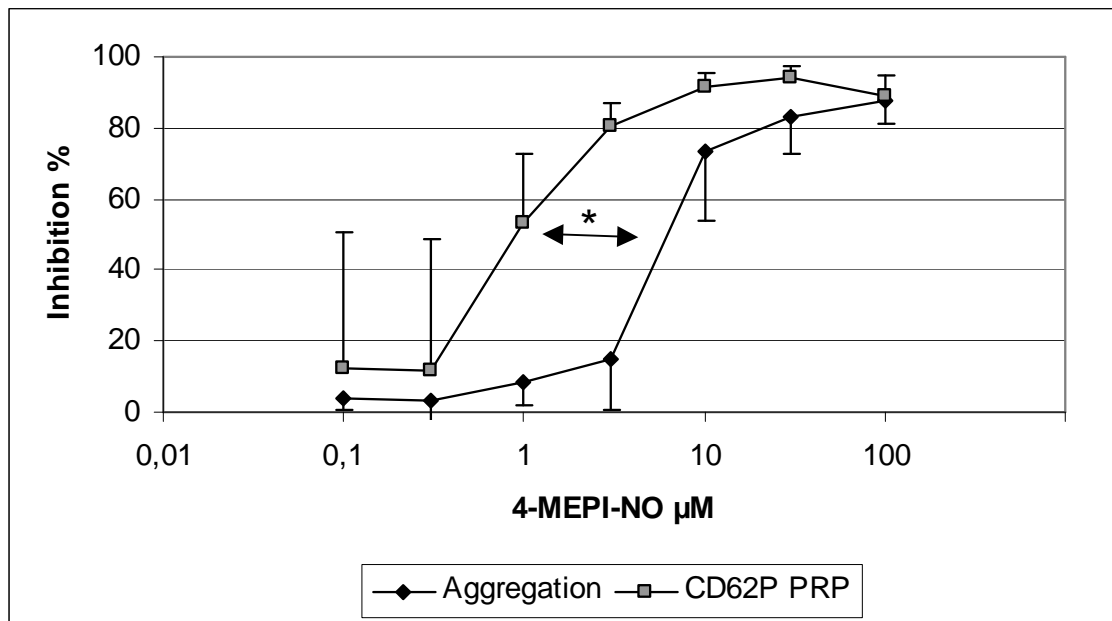


Abb.13 Hemmung der Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)- induzierten Aggregation und CD62P-Expression durch 4-MEPI-NO im PRP. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die angegebene Signifikanz bezieht sich auf den Vergleich der IC₅₀-Werte der Kurven. n = 5.

* p < 0,05

Konjugate: Der Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Bildung von Plättchen-Monozyten- oder Plättchen-Granulozyten-Konjugaten im Vollblut ist in Abbildung 14 dargestellt.

Betrachtet man die Anzahl der CD42a-positiven Monozyten bezogen auf die Gesamtzahl der Monozyten, war weder ein signifikanter Anstieg der positiven Monozyten durch Collagen noch eine Verminderung durch 4-MEPI-NO festzustellen. Bereits in der Negativkontrolle waren $86,6 \pm 21,3\%$ der Monozyten CD42a-positiv, nach Collagenstimulation $89,3 \pm 6,6 \%$. In Anwesenheit von 100 μM 4-MEPI-NO nahm die Anzahl der positiven Monozyten noch zu auf $94,2 \pm 4,2 \%$ (p < 0,05).

Eine etwas andere Konstellation ergab sich bei Betrachtung der Fluoreszenz pro Ereignis: hier zeigte sich ein signifikanter (p < 0,005) Anstieg der Fluoreszenz der CD42a-positiven Monozyten nach Stimulation mit Collagen von $364,7 \pm 228,9$ auf $2396,8 \pm 1256,4$ durchschnittlicher Fluoreszenz pro Ereignis. 4-MEPI-NO führte zu keinen signifikanten Veränderungen der Fluoreszenzen.

Die Zahl der CD42a-positiven Granulozyten stieg von $35,9 \pm 10,5\%$ nach Collagenstimulation auf $53,9 \pm 15,8 \%$ (nicht signifikant). Durch 4-MEPI-NO wurde die Zahl der positiven Granulozyten tendenziell erhöht. Ähnliche Ergebnisse ergaben sich bei Betrachtung der Fluoreszenz. Hier stieg die Fluoreszenz nach Collagenstimulation von $81,5 \pm 42,0$ auf $335,6 \pm 133,8$ an (p < 0,005). 4-MEPI-NO führte tendenziell ebenfalls zu einem weiteren Anstieg der Fluoreszenz.

In der Literatur werden die Basalwerte der Konjugatbildung (bei Messung sofort nach Blutabnahme) bei Plättchen-Monozyten-Konjugaten mit 20-30% angegeben, bei Plättchen-Granulozyten-Konjugaten mit 10-15% (Redlich et al. 1997). Bereits durch die Inkubationsbedingungen ohne Collagen kam es also zur Aktivierung mit Konjugatbildung.

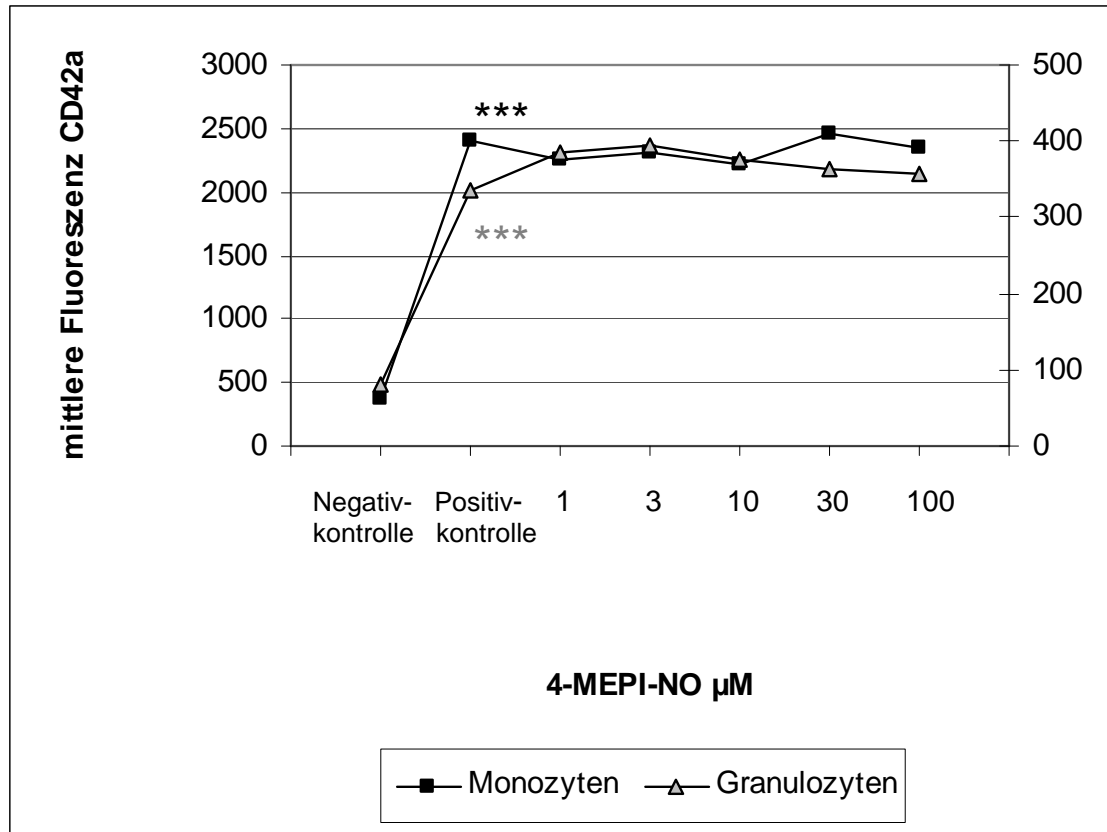


Abb.14 Plättchen-Monozyten- und Plättchen-Granulozyten-Konjugate nach Stimulation mit Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$) im Vollblut. Dargestellt sind die Mittelwerte der mittleren FITC-CD42a-Fluoreszenz pro Ereignis. Die linke Y-Achse zeigt die mittlere Fluoreszenz der Monozyten, die rechte Y-Achse stellt die Fluoreszenz der Granulozyten dar. Die Standardabweichungen liegen bei den Plättchen-Monozyten-Konjugaten zwischen 230 und 1260, bei den Plättchen-Granulozyten-Konjugaten zwischen 42 und 152. $n = 6-7$. Die Angabe der Signifikanzen bezieht sich auf den Vergleich zwischen Negativ- und Positivkontrolle. *** $p < 0,005$.

5.2 Untersuchungen zur Wirkdauer und zum Wirkmechanismus

5.2.1 Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO nach Inkubation im Vollblut sowie Langzeitinkubation im PRP

Fragestellung In den bislang beschriebenen Experimente hatte sich eine gute Wirksamkeit von 4-MEPI-NO im PRP, nicht aber im Vollblut gezeigt. Dieser Unterschied könnte durch eine sehr schnelle Inaktivierung des freigesetzten NO durch Hämoglobin in den Vollblutproben erklärt werden.

Im Institut für Pharmazie der Universität Jena war die Halbwertszeit (HWZ) von 4-MEPI-NO im Phosphatpuffer bei einem pH-Wert von 7,4 spektrophotometrisch bestimmt worden und betrug 105 Sekunden. Damit steht die Dauer der hemmenden Wirkung im PRP, die sich über einen Zeitbereich von 3 bis 12 Minuten nicht veränderte, auch im Widerspruch zur kurzen HWZ des 4-MEPI-NO, die zwar bei einem pH-Wert von 7,4 allerdings in Puffer und nicht im Plasma gemessen wurde. Es sollten daher zwei Fragen beantwortet werden:

1. Lässt sich eine Wirkung von 4-MEPI-NO nach Inkubation im Vollblut nachweisen, wenn die Erythrozyten nach dieser Inkubation entfernt werden?
2. Ist eine Wirkung von 4-MEPI-NO auch bei längeren Inkubationszeiten nachweisbar?

Durchführung Zur Untersuchung dieser Fragen wurden zunächst Vollblutproben für 5 Minuten mit 4-MEPI-NO in ansteigenden Konzentrationen (1-100 μM) inkubiert und danach durch Zentrifugation PRP hergestellt. Nach einer „Ruhezeit“ für das PRP von 15 Minuten wurde die ADP-induzierte Plättchenaggregation (20 μM ADP) im PAP4C-Aggregometer aufgezeichnet. Parallel dazu wurden PRP-Proben mit 4-MEPI-NO in gleichen Konzentrationen für 30 Minuten inkubiert und ebenfalls die ADP-induzierte Aggregation bestimmt. Damit waren in beiden Fällen die Plättchen für die gleiche Zeit in Kontakt mit dem Hemmstoff. Zusätzlich wurden Inkubationen im Vollblut und PRP mit 4-MEPI-NO (10 und 30 μM) bis zu 45 bzw. 75 Minuten durchgeführt und die Aggregabilität der Plättchen bestimmt.

Ergebnisse In Abbildung 15 sind die Dosis-Wirkungskurven der Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO nach Inkubation im Vollblut und vergleichend nach Inkubation im PRP bei einer absoluten Einwirkungszeit auf die Plättchen von 30 Minuten gezeigt. Die IC_{50} -Werte unterschieden sich nicht signifikant ($20,1 \pm 17,1$ bzw. $14,1 \pm 15,0$ μM).

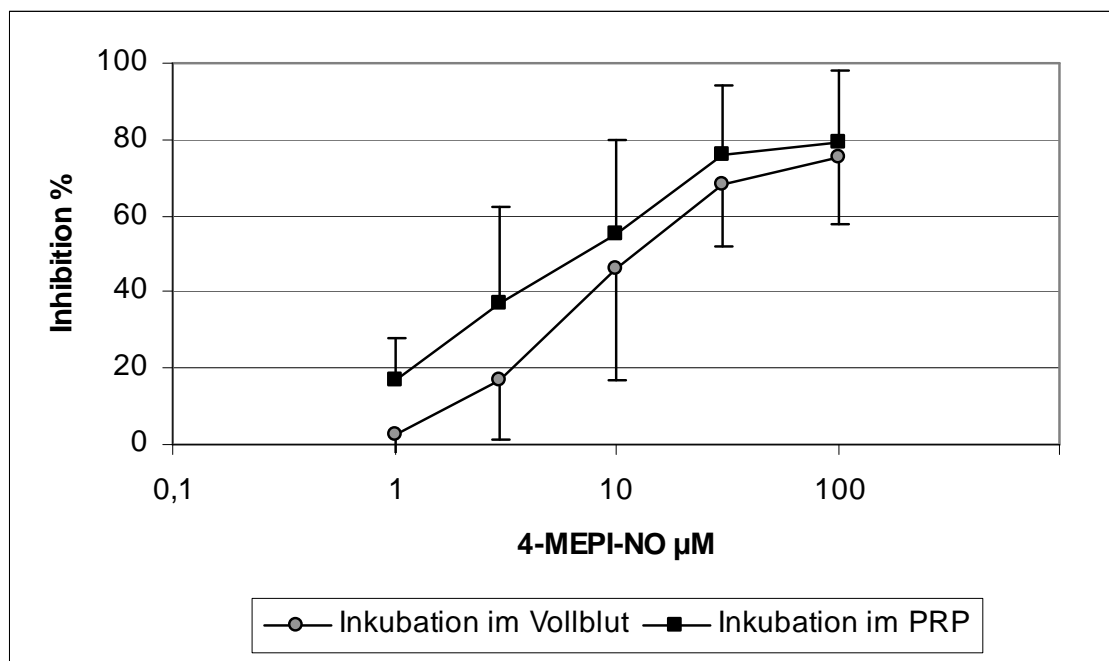


Abb.15 Hemmung der ADP (20 μM)-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO nach Inkubation im PRP oder im Vollblut. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. n = 6

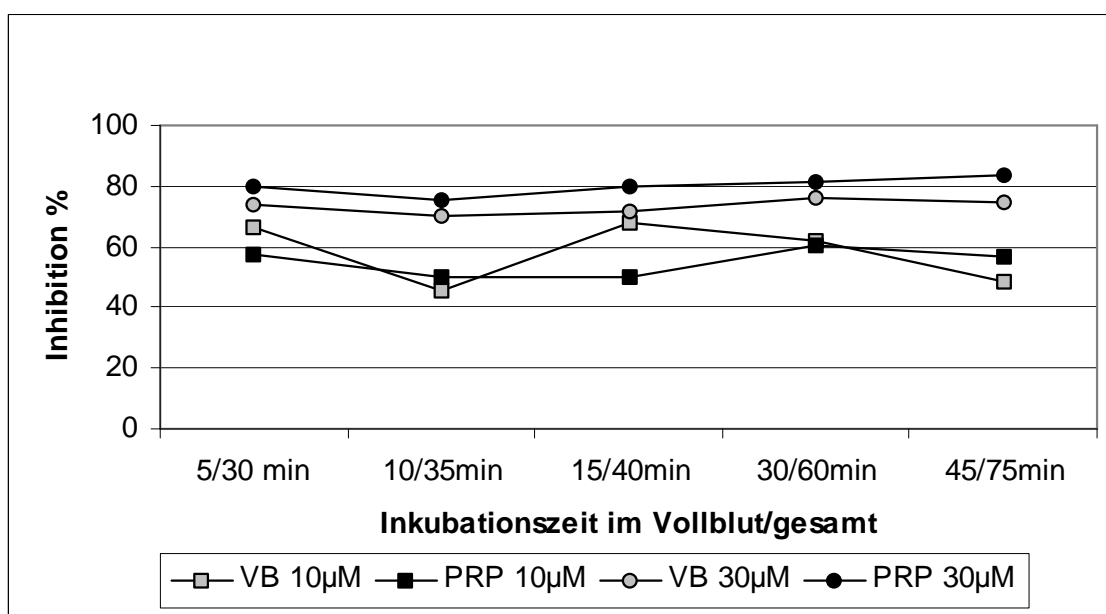


Abb.16 Hemmung der Aggregation im PRP und Vollblut (VB) bei verschiedenen Inkubationszeiten (Zeit im Vollblut/gesamte Inkubationszeit). Dargestellt sind die Mittelwerte. Die Standardabweichungen sind aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt, sie liegen zwischen 12,3 und 32,8. n = 4-5

Abbildung 16 zeigt die Hemmung der Aggregation, die nach verschieden langer Inkubationszeit im Vollblut oder PRP erreicht wurde. Beim Vergleich der Werte unterschiedlich langer Inkubationszeit zeigte sich, dass über die Zeit zwischen 30 und 75 min bei Inkubation im PRP keine Abnahme der Wirkung zu verzeichnen war. Auch nach Inkubation im Vollblut zwischen 5 und 45 min und nachfolgender Messung der Aggregation im PRP (nach insgesamt 30 bis 75 min) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede sowohl zwischen den verschiedenen Inkubationszeiten als auch im Vergleich zur alleinigen Inkubation im PRP.

5.2.2 Plasmatauschexperimente

Fragestellung Die in Kap. 5.2.1 dargestellten Ergebnisse zeigten, dass 4-MEPI-NO im Plasma eine um Größenordnungen verlängerte HWZ im Vergleich zur HWZ im Puffer aufweist und dass die Plättchen-hemmende Wirkung im Vollblut durch die Anwesenheit von Erythrozyten verhindert, nach Entfernung der Erythrozyten aber vorhanden ist. Es sollte daher geprüft werden, ob die Wirkung von 4-MEPI-NO auf die Plättchen durch eine Wechselwirkung mit Plasmakomponenten bedingt ist.

Durchführung und Versuchsbedingungen PRP wurde entweder mit 10 μM 4-MEPI-NO oder dem Lösungsmittel als Kontrolle für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden in beiden Ansätzen Plättchen und Plasma durch Zentrifugation getrennt und die Plättchen im autologen und heterologen Plasma resuspendiert (Abb. 17). In den resultierenden 4 verschiedenen PRP-Proben wurde anschließend die mit 20 μM ADP induzierte Aggregation im PAP4C-Aggregometer aufgezeichnet.

Ergebnisse Abb. 17 zeigt den Versuchsaufbau sowie die Ergebnisse.

Die erreichte Hemmung im Kontroll-PRP diente als Referenzwert (0% Hemmung). In PRP, das mit 4-MEPI-NO inkubiert wurde, betrug die Hemmung der Aggregation $76,9 \pm 13,7 \%$. Wurden die Plättchen aus mit 4-MEPI-NO inkubiertem PRP abgetrennt und in Kontrollplasma (PPP) resuspendiert, war die Hemmung der Aggregation deutlich abgeschwächt und betrug $11,2 \pm 14,0 \%$, die Abnahme der Hemmung der Aggregation war signifikant ($p < 0,005$). Wurden jedoch Plättchen, welche aus Kontroll-PRP abgetrennt wurden, in mit 4-MEPI-NO inkubiertem Plasma (PPP) resuspendiert, war die erzielte

Hemmung stark ausgeprägt und übertraf mit einer Hemmung von $88,3 \pm 9,2 \%$ sogar die Hemmung in der Positivkontrolle (4-MEPI-NO-PRP) ($p < 0,005$).

Zumindest nach der Inkubationszeit von 30 min war also in den Plättchen der Effekt durch 4-MEPI-NO bereits deutlich abgeschwächt. Die Verlängerung der HWZ von 4-MEPI-NO scheint also nicht durch Effekte in den Plättchen zustande gekommen zu sein, sondern erfolgte im Plasma.

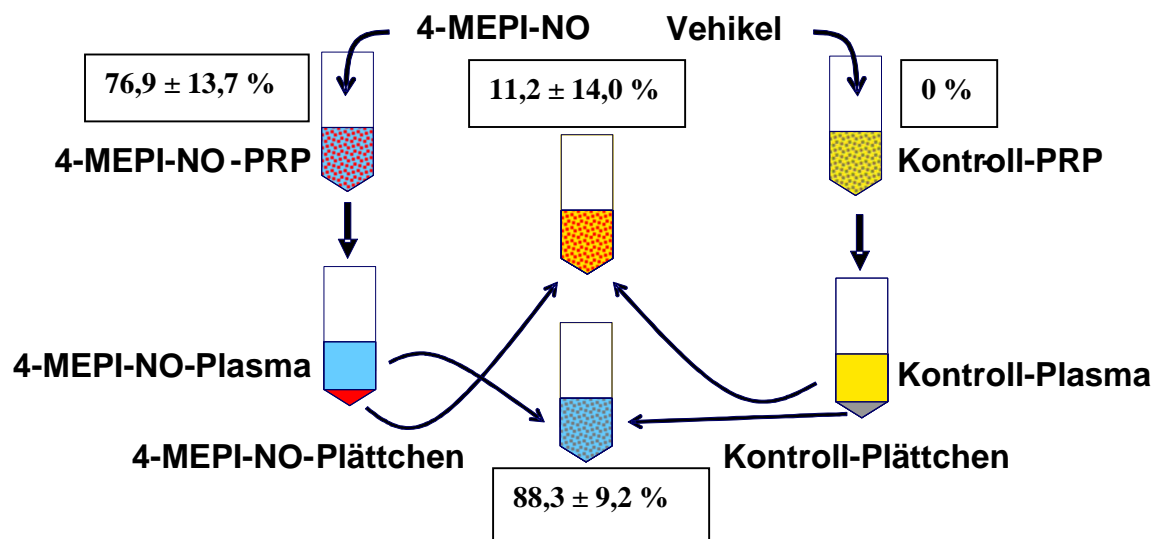


Abb.17 Schematischer Versuchsaufbau der Plasmatauschexperimente. Hemmung der ADP ($20 \mu\text{M}$)-induzierten Aggregation durch $10 \mu\text{M}$ 4-MEPI-NO nach Inkubation im PRP (oben links), nach Resuspension 4-MEPI-NO-behandelter Plättchen in Kontroll-Plasma (Mitte oben) und unbehandelter Plättchen in 4-MEPI-NO-PPP (Mitte unten) im Vergleich zur erzielten Hemmung im Kontroll-PRP (oben rechts). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung, $n = 6-8$. Signifikanz für die Abnahme der Hemmung nach Resuspension der 4-MEPI-NO-Plättchen in Kontroll-Plasma: $p < 0,005$.

5.2.3 Rolle der Guanylatzyklase für die Hemmung der Plättchenaggregation durch 4-MEPI-NO und SNP

5.2.3.1 Einfluss von ODQ auf die Wirkung von SNP und 4-MEPI-NO im PRP

Fragestellung Bei SNP ist bekannt, dass die hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation von der cGMP-Bildung und damit von der Guanylatzyklase abhängig ist. Der Hemmstoff der Guanylatzyklase ODQ führt zum Wirkungsverlust von SNP.

Ist die Wirkung von 4-MEPI-NO von der Signaltransduktion durch cGMP abhängig oder findet eine Wirkung auch unabhängig von cGMP statt?

Durchführung PRP wurde bei 37°C 20 min mit ODQ (100 µM) oder dessen Lösungsmittel DMSO inkubiert, dann wurde 4-MEPI-NO oder SNP dazugegeben und weitere 10 Minuten inkubiert. Die Aggregation wurde durch Zugabe von Collagen (10 µg/ml) ausgelöst.

Ergebnisse Der Einfluss von ODQ auf die 4-MEPI-NO-vermittelte Hemmung der Aggregation ist in Abbildung 18 dargestellt. Beim Vergleich zwischen den Proben mit ODQ-Zusatz und den Proben, denen nur das Vehikel DMSO zugesetzt wurde, zeigte sich, dass durch ODQ die Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO im Mittel nur geringfügig und nicht signifikant vermindert wurde (etwa zwischen 1 und 5 Prozent). Hierbei war die Verminderung tendenziell etwas stärker bei der geringsten 4-MEPI-NO-Konzentration (10 µM) ausgeprägt.

Abbildung 19 zeigt den Einfluss von ODQ auf die SNP-vermittelte Hemmung der Aggregation. Mit Werten um 50% war die Hemmung der Aggregation durch SNP im Vergleich zu 4-MEPI-NO geringer. Beim Vergleich zwischen den Mittelwerten der Proben mit ODQ-Zusatz und denen nur mit DMSO zeigte sich, dass bei Anwesenheit von ODQ die SNP-vermittelte Hemmung der Aggregation fast vollständig aufgehoben war. Es war nur noch eine Restwirkung im einstelligen Prozentbereich zu verzeichnen. Die Unterschiede sind signifikant (bei SNP 100µM $p < 0,05$, 30µM $p < 0,005$, 10µM $p < 0,01$).

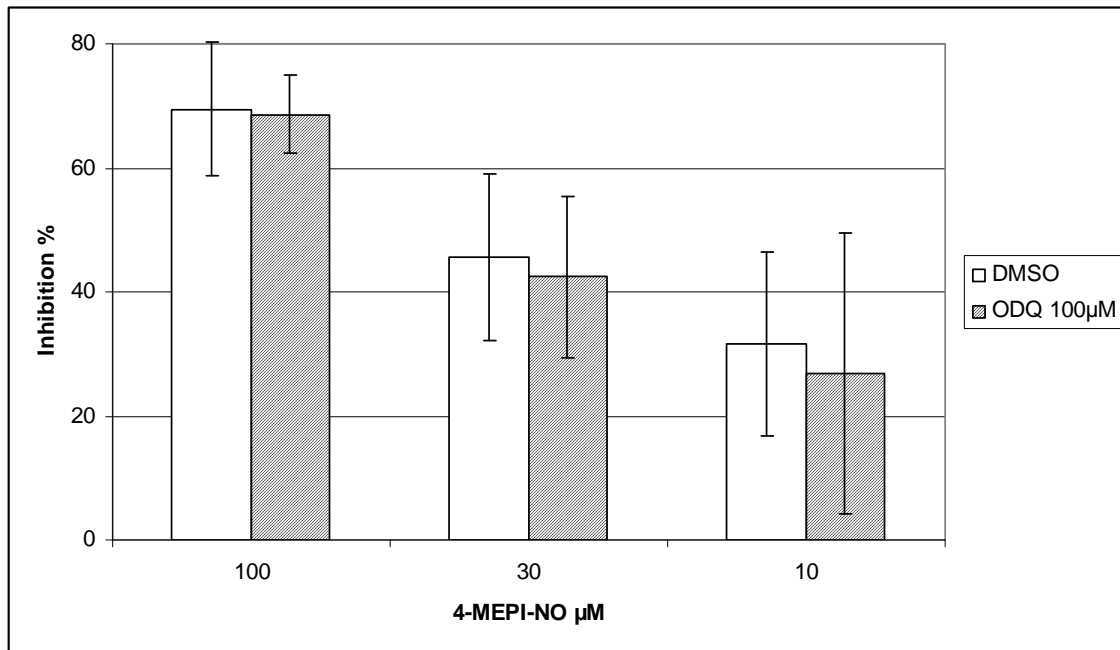


Abb.18 Hemmung der Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)-induzierten Aggregation durch 4-MEPI-NO in % mit und ohne Zusatz von 100 μM ODQ. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. n = 5

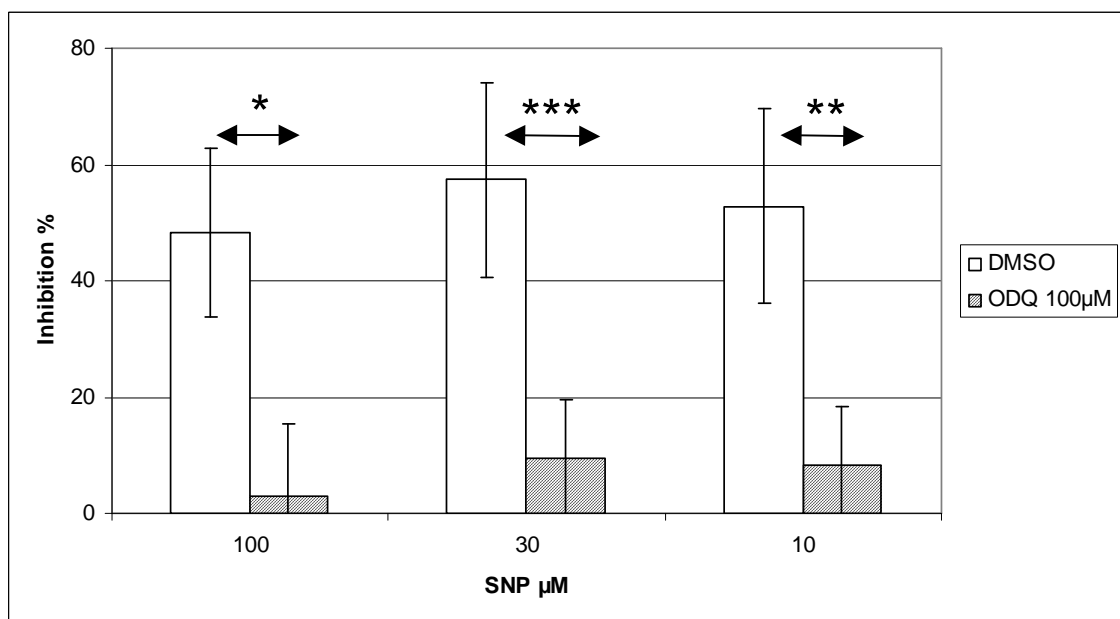


Abb.19 Hemmung der Collagen (10 $\mu\text{g/ml}$)-induzierten Aggregation durch SNP in % mit und ohne Zusatz von 100 μM ODQ. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM. n = 4-5.

* p < 0,05. ** p < 0,01. *** p < 0,005

5.2.3.2 Einfluss von ODQ auf die cGMP-Spiegel nach 4-MEPI-NO- oder SNP-Stimulation

Fragestellung Führen 4-MEPI-NO und SNP zu einem Anstieg der cGMP-Konzentration, und inhibiert ODQ die cGMP-Bildung bei 4-MEPI-NO und SNP?

Durchführung Zu allen Proben wurde der Hemmstoff der Phosphodiesterase IBMX (0,5 mM) gegeben. Nach 10 Minuten Inkubationszeit bei 37°C wurde ODQ (100 µM) oder dessen Lösungsmittel DMSO zugegeben und weitere 10 Minuten inkubiert. Dann erfolgte die Zugabe von 4-MEPI-NO oder SNP (10 µM). Nach weiteren 10 Minuten wurde den Proben das gleiche Volumen 0,2 M HCl zugegeben. Kontrollen wurden mitgeführt.

Ergebnisse Die cGMP-Spiegel nach Stimulation durch SNP und 4-MEPI-NO, mit und ohne Zusatz von ODQ, sind in Abbildung 20 dargestellt. Die basale cGMP-Konzentration ohne Stimulation betrug $6,3 \pm 1,1$ pmol/ml. Nach Stimulation mit 10 µM 4-MEPI-NO war ein Anstieg der cGMP-Konzentration auf etwa den achtfachen Wert zu verzeichnen. Der durch 10 µM SNP verursachte Anstieg war mit einer Steigerung auf den dreifachen Wert geringer ausgeprägt. ODQ hatte keine Einfluss auf die basale cGMP-Konzentration. Durch Stimulation mit 4-MEPI-NO kam es bei Anwesenheit von ODQ nur zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels auf knapp den doppelten Wert, SNP führte kaum zu einem Anstieg. Aufgrund der geringen Fallzahl und nach α -Adjustierung nach Holm waren die Unterschiede nicht signifikant.

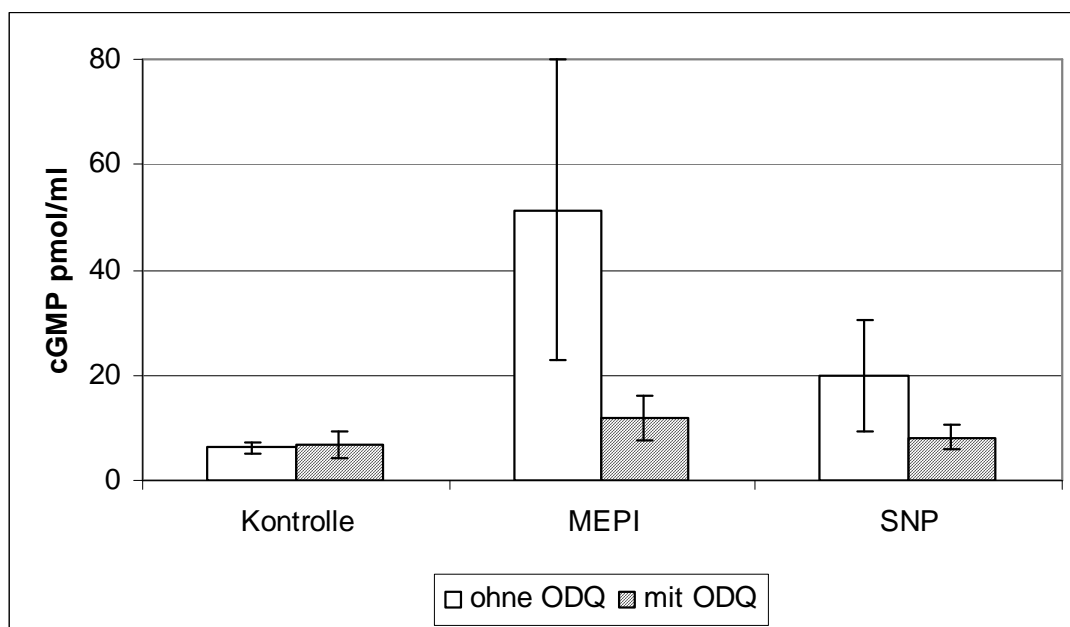


Abb.20 cGMP-Spiegel nach Stimulation mit 10 µM 4-MEPI-NO oder SNP mit und ohne Zusatz von 100 µM ODQ. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung. n = 4

6. Diskussion

Plättchenaktivierung und Plättchenaggregation gehören zu den wesentlichen physiologischen Vorgängen im Rahmen der primären Hämostase. Sie sind ebenfalls pathophysiologisch relevant bei der Entwicklung der Atherosklerose, bei der arteriellen Thrombose im Rahmen von Schlaganfällen, Myokardinfarkten und Restenosierungen nach perkutaner Koronarintervention (Huo und Ley 2004, Rauch et al. 2001, Janero und Ewing 2000).

Trotz wichtiger Verbesserungen in der Therapie der arteriellen Thrombose in den letzten Jahren können die derzeit verfügbaren Anti-Plättchen-Wirkstoffe die kurz- oder langfristige Progression der Atherosklerose oft nicht verhindern, da sie nicht wirksam genug sind oder zu kurz verabreicht werden. Daher besteht weiterhin ein Bedarf an neuen Substanzen, die sowohl die Thrombenbildung effektiv unterbinden können als auch das Blutungsrisiko nicht zu stark erhöhen, und die auch langfristig gegeben werden können (Rauch et al. 2001).

Ein wichtiges Therapieziel ist neben der Hemmung der Aggregation die Hemmung der Plättchenaktivierung, welche bei den GPIIb/IIIa-Antagonisten kaum vorhanden ist (André 2004). Die Plättchenaktivierung führt über Kontakte zwischen aktivierten Plättchen und Leukozyten zur Induktion von Entzündungsvorgängen. Die im Rahmen der Aktivierungsreaktion stattfindende Degranulation der Plättchen führt zur Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer und proliferativ wirksamer Substanzen. Von der Hemmung der Plättchenaktivierung verspricht man sich daher eine anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkkomponente, die positive Auswirkungen auf die Progression der Atherosklerose haben könnte (André 2004). Als sensitive Marker der Plättchenaktivierung gelten CD62P und Plättchen-Monozyten-Konjugate (André 2004, Furie et al. 2001).

NO-Donatoren werden bisher zur Vasodilatation eingesetzt, haben aber auch eine plättchenhemmende Wirkkomponente. Der Einsatz von NO-Donatoren zur Plättchenhemmung wäre ein vielversprechendes Wirkprinzip, da der physiologische Botenstoff NO, der bei Atherosklerose vermindert ist (Anderson 2003, Janero und Ewing 2000, Freedman und Loscalzo 2003), so ersetzt werden könnte.

In der Vielzahl der NO-Donatoren stellen die Diazeniumdiolate eine relativ neue und vorteilhafte Substanzgruppe dar. Sie zeichnen sich vor allem durch eine spontane und verlässliche NO-Freisetzung im physiologischen Milieu aus (Fitzhugh und Keefer 2000).

In der vorliegenden Arbeit wurde das Diazeniumdiolat 4-MEPI-NO hinsichtlich seiner Wirkung auf die Plättchenaggregation und Plättchenaktivierung untersucht. Weiterhin sollten

Aussagen zur Zeitdauer der Wirkung, zur Wirkung in Anwesenheit von Erythrozyten und zur Signaltransduktion getroffen werden.

In unseren Versuchen konnte mit 4-MEPI-NO eine gute Hemmung der Plättchenfunktion im PRP erzielt werden, bei jedoch geringer oder sogar fehlender Wirkung im Vollblut. Es erscheint daher fraglich, ob 4-MEPI-NO *in vivo* die Plättchenaktivierung hemmen kann. Die Unwirksamkeit von NO-Donatoren im Vollblut *in vitro* stellt ein bekanntes Problem dar, welches auf die rasche Bindung von NO an Hämoglobin zurückzuführen ist (Liu et al. 1998, Megson et al. 2000). Die Plättchen-Wirksamkeit von NO-Donatoren *in vivo* ist wenig untersucht. Verschiedene Autoren haben jedoch über systemische Wirkungen von inhaliertem NO auf die Plättchenfunktion berichtet. So konnten Gries et al. (2000) zeigen, dass die Inhalation von NO durch gesunde Probanden zu einer systemisch nachweisbaren Minderung der Collagen-induzierten Plättchenaggregation (bei Messung *ex vivo* im PRP) und der ADP-induzierten CD62P-Expression (im Vollblut) führte. Übereinstimmend stellten auch Beghetti et al. (2003) eine Verminderung der Plättchenaggregation nach Inhalation von NO fest. Die Bildung von S-Nitrosothiolen im Plasma wird als ein möglicher Mechanismus der systemischen Wirkung von NO angesehen (Wallis 2005). Bei Infusion von NO oder S-Nitrosoglutathion (GSNO) in den Unterarm waren am kontralateralen Unterarm signifikant erhöhte Spiegel von Plasma-Nitrosothiolen messbar (Rassaf et al. 2002). GSNO führte *in vivo* nach Myokardinfarkt zur Hemmung der Plättchenaktivierung, bestimmt durch CD62P-Expression und GPIIbIIIa-Expression (Langford et al. 1996).

Darüber hinaus existiert an der für thrombotische Ereignisse relevanten Endothelgrenze eine relativ Plättchen-reiche und Erythrozyten-arme Zone (Aarts et al. 1988), sodass dort NO-Donatoren möglicherweise selektiv wirksam werden könnten. Vor diesem Hintergrund erscheint es sinnvoll die Ergebnisse aus den Messungen im PRP zu diskutieren.

Zunächst wurde die Hemmung der Plättchenaggregation durch 4-MEPI-NO im Vergleich zu SNP mit der klassischen Methode nach Born (Born 1962) untersucht. Dabei zeigte 4-MEPI-NO im PRP eine gute Hemmung sowohl der Collagen- als auch der ADP-induzierten Plättchenaggregation mit maximal erreichbaren Hemmungen von 80-90%. Die IC₅₀-Werte lagen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zwischen 1 und 4 µM. Im direkten Vergleich mit SNP wurde die ADP-induzierte Aggregation ähnlich gut gehemmt, während bei der Collagen-induzierten Aggregation mit 4-MEPI-NO deutlich bessere maximale Hemmungen erzielt werden konnten. Collagen und ADP sind zwei Agonisten mit differierender Stärke und Aktivierungsweise. Unabhängig von der Art des Agonisten führte 4-MEPI-NO zu einer

starken Hemmung der Aggregation, auch bei den verwendeten vergleichsweise hohen Konzentrationen der Agonisten Collagen und ADP.

Der Vergleich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen bezüglich der Aggregationshemmung ist generell problematisch, da für die Messung der Plättchenaggregation keine Standards existieren. Die Aufbereitung der Plättchen u.a. hinsichtlich Plättchenzahl, Messung im PRP oder Vollblut, Art und Konzentrationen der Agonisten und verwendeter Messgeräte sind uneinheitlich (Harrington et al. 1998). Trotzdem soll der Versuch eines Vergleichs mit anderen NO-Donatoren und Anti-Plättchen-Wirkstoffe unternommen werden.

Vergleich mit anderen NO-Donatoren: Zwei untersuchte Nitrosothiole (GSNO und RIG200) wiesen bei vergleichbaren Bedingungen ähnliche IC₅₀-Werte im einstelligen mikromolaren Bereich auf (Megson et al. 2000). MAHMA-NONOat, ein Diazeniumdiolat, zeigte bei der Ratte ebenfalls einen ähnlichen Bereich der IC₅₀-Werte mit Werten im einstelligen mikromolaren Bereich und der maximal erreichten Hemmung der Aggregation mit Werten von 90% (Homer und Wanstall 2002). Gordge et al. (1998) stellten bei dem Diazeniumdiolat DEA/NO eine 80%ige maximale Hemmung und IC₅₀-Werte im Bereich von 0,1 µM fest, allerdings bei niedrigeren Collagen-Konzentrationen. In einer kürzlich erschienenen Publikation wurden vier Diazeniumdiolate untersucht, bei denen sich eine 80-90%ige Hemmung der ADP-induzierten Aggregation humaner Plättchen zeigte und IC₅₀-Werte im Bereich von 0,1 bis 3 µM erreicht wurden (Abuo-Rahma et al. 2005). Die verwendete ADP-Konzentration war mit 5 µM etwas niedriger.

Vergleich mit GPIIb/IIIa-Antagonisten: Matzdorff et al. (2001) berichteten bei drei untersuchten Substanzen von einer über 80%igen maximalen Hemmung bei gleichen Stimulationsbedingungen wie bei unseren Versuchen mit 4-MEPI-NO.

Damit stellt sich 4-MEPI-NO als potenter Inhibitor der Plättchenaggregation im PRP dar und reiht sich hinsichtlich maximaler Wirkstärke in die Reihe der gut Plättchen-wirksamen NO-Donatoren und der GPIIb/IIIa-Antagonisten ein. 4-MEPI-NO erreichte ähnliche IC₅₀-Werte wie andere bereits getestete Diazeniumdiolate.

Ein Vergleich mit inhaliertem NO oder mit Clopidogrel ist schwer möglich, da die Messung der Wirkung nur ex vivo erfolgen kann.

In einem weiteren Schritt sollten Wirkungsunterschiede hinsichtlich Hemmung der Mikro- und Makroaggregatbildung durch 4-MEPI-NO untersucht werden.

Bei der Aggregation entstehen zunächst in einer schnellen Reaktion Mikroaggregate, welche im weiteren Verlauf mittlere und große Aggregate bilden (Matsuno et al. 1999).

Mikroaggregate spielen eine Schlüsselrolle bei der Thrombusbildung in vivo, da sie einen Trigger für die Bildung von Thromben darstellen (Matsuno et al. 1999). Bei Patienten mit fortgeschrittener Atherosklerose und akutem Koronarsyndrom ist die spontane Bildung von Mikroaggregaten erhöht (McBane et al. 2003) und darüber hinaus stellt die vermehrte Bildung von Mikroaggregaten nach Stimulation ex vivo einen unabhängigen Prädiktor kardiovaskulärer Ereignisse bei der koronaren Herzkrankheit dar (Miyamoto et al. 2003).

Die klassische Aggregometrie nach Born mit Messung der Lichttransmission kann Mikroaggregate nicht erfassen, sondern erst Aggregate ab einer Größe von etwa 100 Plättchen (Storey et al. 1998). Mit anderen Messmethoden wie der Laserlight-scattering-Aggregometrie oder der Durchflusszytometrie ist die Erfassung der Mikroaggregatbildung möglich. Bei Anwendung dieser Methoden wurde bei verschiedenen Anti-Plättchen-Wirkstoffen ein wesentlicher Unterschied zwischen der Hemmung der Makroaggregation und Hemmung der Mikroaggregation festgestellt. So ist zum Beispiel ASS, trotz guter Suppression der Makroaggregation, nicht in der Lage, die Mikroaggregatbildung wirkungsvoll zu unterdrücken (Miyamoto et al. 2003, Matsuno et al. 1999). Auch GPIIb/IIIa-Antagonisten hemmen die Mikroaggregatbildung deutlich geringer als die Makroaggregatbildung (Matzdorff et al. 2001, Storey et al. 1998).

Bei akutem Myokardinfarkt ist das Auftreten von subendokardialen Mikrothrombosierungen beschrieben, welche auf Mikroaggregate zurückgeführt werden, die während der frühen Phase des akuten Myokardinfarkts aus den Koronarien ausgewaschen werden (Gasser et al. 1987). Bei einer unvollständigen Hemmung der Mikroaggregatbildung, wie sie bei GPIIb/IIIa-Antagonisten beschrieben ist, könnte somit zwar die Bildung großer Thromben verhindert werden, nicht jedoch eine Mikrothrombosierung in kleinen subendokardialen Gefäßen.

Die Bedeutung der Mikroaggregatbildung in vitro für die Situation in vivo ist jedoch nicht vollständig geklärt.

In unseren Versuchen wurde PRP nach 5-minütiger Vorinkubation mit 4-MEPI-NO mit 1 μ M ADP stimuliert. Mit Hilfe des Laseraggregometers wurde parallel die Makro- und Mikroaggregatbildung bestimmt. Es stellte sich heraus, dass die Makroaggregation mindestens um den Faktor 10 besser gehemmt werden konnte als die Mikroaggregation. Während die Makroaggregation fast vollständig unterdrückt werden konnte, betrug die maximale Hemmung der Mikroaggregatbildung nur 90%, entsprechend einer relativen Aggregatgröße von 1,7. Die Vergrößerung der Aggregatgröße durchschnittlich auf die 1,7fache Größe konnte also auch bei hohen 4-MEPI-NO-Konzentrationen nicht gehemmt werden.

NO-Donatoren sind bezüglich dieser Fragestellung bisher nicht untersucht worden, Untersuchungen existieren jedoch für ASS und GPIIb/IIIa-Antagonisten.

Matzdorff et al. (2001) untersuchten unter vergleichbaren Bedingungen (2 μ M ADP als Agonist) die Hemmung der Mikro- und Makroaggregation durch drei GPIIb/IIIa-Antagonisten. Sie stellten fest, dass selbst bei supramaximalen Konzentrationen die Mikroaggregation nur zu 70-90% inhibiert werden konnte, während die Makroaggregation vollständig unterdrückt war. Bei Verwendung einer anderen Methode zur Detektion der Mikroaggregate liefern Matzdorff et al. (2001) damit ähnliche Ergebnisse.

Im Gegensatz dazu stellten Matsuno et al. (1999) beim Hamster eine vollständige Suppression der Mikroaggregatbildung ex vivo durch einen GPIIb/IIIa-Antagonisten fest, allerdings bei hoher Collagenkonzentration, während ASS keine Hemmung der Mikroaggregation zeigte.

Storey et al. (1998) verglichen bei GPIIb/IIIa-Antagonisten die IC₅₀-Werte, die zur Hemmung der Mikro- und Makroaggregation nötig waren. Sie berichteten, dass im Vergleich zur Makroaggregation eine etwa 3-fach höhere Dosis nötig war, um die Mikroaggregation zu inhibieren. Sie lieferten keine Informationen darüber, ob die Mikroaggregation durch GPIIb/IIIa-Antagonisten vollständig unterdrückt werden konnte.

Die Mechanismen, die für die unterschiedliche Wirksamkeit auf die Mikro- und die Makroaggregation verantwortlich sind, sind bisher unbekannt.

Bei den GPIIb/IIIa-Antagonisten wurde die geringere Hemmbarkeit der Mikroaggregation mit verschiedenen Theorien erklärt, welche die Wirkung am Rezeptor GPIIb/IIIa betreffen. So wurde vermutet, dass ein geringer Teil der GPIIb/IIIa-Moleküle bereits mit Fibrinogen verbunden sei und damit nicht mehr durch GPIIb/IIIa-Antagonisten gehemmt werden könne (Matzdorff et al. 2001). Weiterhin wurden Unterschiede in der Affinität zum ruhenden und aktivierten GPIIb/IIIa-Molekül als Erklärung für Differenzen in der Hemmbarkeit der schnellen Mikroaggregation und der langsamen Makroaggregation angeführt (Storey et al. 1998). Gawaz et al. (2000) berichteten über in den Plättchen gespeicherte GPIIb/IIIa-Moleküle, die erst nach Aktivierung exprimiert werden, nicht von GPIIb/IIIa-Antagonisten erreicht werden und damit nach Aktivierung zur Verfügung stehen.

Bei ASS ist die ungenügende Suppression der Mikroaggregation nachvollziehbar, da ASS mit der Unterdrückung der TXA₂-Synthese nur einen Verstärkungsweg der Aggregation blockiert und damit vor allem die Makroaggregation bei schwachen Stimuli vermindern kann. Dagegen können stärkere Stimuli die Hemmung der Aggregation durch ASS durchbrechen (Matsuno et al. 1999).

4-MEPI-NO greift als NO-Donator sehr viel unspezifischer in die Signaltransduktion ein und beeinflusst anders als die GPIIb/IIIa-Antagonisten nicht nur die Aggregation sondern auch die Aktivierungsreaktion. Daher lassen sich die oben beschriebenen Erklärungsmodelle auf die beobachteten Wirkungsunterschiede bei 4-MEPI-NO nicht anwenden.

Makro- und Mikroaggregation könnten auf verschiedenen Mechanismen beruhen, die unterschiedlich gut gehemmt werden können. McBane et al. (2003) konnten jedoch zeigen, dass die (spontane) Mikroaggregatbildung, ebenso wie die Makroaggregation, durch GPIIb/IIIa-Interaktion zustande kommt und dass daran weder Gerinnungsfaktoren, noch Interaktionen mit Leukozyten oder spontane Agglutination maßgeblich beteiligt sind.

Möglicherweise unterscheiden sich Makro- und Mikroaggregation trotzdem in begleitenden Mechanismen neben dem Grundmechanismus der GPIIb/IIIa-Vernetzung. So ist beispielsweise die Bildung großer Aggregate von der CD62P-Expression abhängig (Merten und Thiagarani 2000).

Zusätzlich könnte die Kinetik eine Rolle spielen. Die Mikroaggregation geschieht innerhalb von 1s als Antwort auf eine Stimulation durch ADP, während sich die Makroaggregate über einen längeren Zeitraum entwickeln (Storey et al. 1998). Durch diese schnelle Reizantwort ist die Mikroaggregation im Vergleich zur Makroaggregation möglicherweise insensitiver gegenüber einer Hemmung. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass eine Subpopulation von schwerer zu hemmenden beziehungsweise leichter zu aktivierenden Plättchen existiert.

Weiterhin sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von 4-MEPI-NO auf die Plättchenaktivierung anhand von CD62P-Expression und Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten untersucht werden.

CD62P ist ein Marker der Plättchenaktivierung und nimmt eine Schlüsselrolle bei der Interaktion zwischen Plättchen, Leukozyten und Endothel im Rahmen von Thrombose, Atherogenese und Inflammation ein (André 2004). CD62P ist daneben bedeutsam für die Bildung und Stabilisierung großer Plättchenaggregate (Merten und Thiagarani 2000), möglicherweise über eine Interaktion zwischen CD62P und GPIIb (André 2004).

Plättchen-Leukozyten-Konjugate entstehen durch Interaktion zwischen CD62P auf Plättchen und PSGL-1 auf Leukozyten (André 2004). Die Formierung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten führt zum sogenannten „Priming“ von Plättchen und Leukozyten. Folge ist eine Hyperreaktivität und vermehrte Zytokinsynthese der Leukozyten (Huo und Ley 2004). Daher wird eine Verminderung der Plättchen-Leukozyten-Konjugate als Marker für die anti-inflammatorische Wirkung von Anti-Plättchen-Wirkstoffen angesehen (André 2004).

Plättchen-Monozyten-Konjugate gelten im Vergleich zu CD62P als sensitiverer Parameter für die Plättchenaktivierung *in vivo* (Michelson et al. 2001). Dies wird damit begründet, dass aktivierte Plättchen *in vivo* rasch auf der Oberfläche exprimiertes CD62P verlieren, während Plättchen-Monozyten-Konjugate eine längere HWZ aufweisen (Michelson et al. 2001). *In vitro* ist die CD62P-Expression jedoch nicht reversibel (Michelson et al. 2001). Plättchen-Monozyten-Konjugate gelten darüber hinaus als sensitiver Parameter für Gefäßerkrankungen (André 2004).

Die klinische Relevanz von CD62P und Plättchen-Leukozyten-Konjugaten ist für viele vaskuläre Erkrankungen belegt. CD62P-positive Plättchen und Plättchen-Leukozyten-Konjugate sind erhöht bei Diabetes mellitus (Hu et al. 2004) und stabiler Atherosklerose (Furman et al. 1998). Eine erhöhte Anzahl an Plättchen-Leukozyten-Konjugaten findet sich darüber hinaus bei instabiler Angina, akutem Myokardinfarkt und nach PTCA (Michelson et al. 2001). CD62P ist erhöht bei hypercholesterolämischen Mäusen (Tailor und Granger 2003) und bei atherothrombotischem Schlaganfall (Yamazaki et al. 2001). Hier führte nur Ticlopidin aber nicht ASS allein zu einer Verminderung der CD62P-positiven Plättchen (Yamazaki et al. 2001).

CD62P gilt als mögliches Ziel einer Therapie, da Studien gezeigt haben, dass die Blockade von CD62P die endogene Fibrinolyse und arterielle Thrombolyse verstärkt (André 2004, Caron et al. 2002, Merten und Thiagarani 2000). Der Blockade von CD62P wird auch eine anti-inflammatorische und anti-proliferative Wirkung zugeschrieben, da der Granulainhalt die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen verstärkt und CD62P über Priming von Leukozyten Entzündungsvorgänge induzieren kann (André 2004).

GPIIb/IIIa-Antagonisten hemmen nur die Aggregation nicht aber die Plättchenaktivierung und verhindern damit nicht das Erscheinen von CD62P auf der Plättchenoberfläche. Verschiedene Autoren berichten sogar über eine zunehmende CD62P-Expression (Matzdorff et al. 2001) bzw. gesteigerte Formierung von Plättchen-Monozyten-Konjugaten (Scholz et al. 2002) unter GPIIb/IIIa-Antagonisten und führen in diesem Zusammenhang die Gefahr einer Disseminierung prothrombotischer Oberflächen bei der Anwendung von GPIIb/IIIa-Antagonisten an.

ASS allein ist nicht in der Lage, die Plättchenaktivierung bei Zuständen wie akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina vollständig zu unterdrücken (Langford et al. 1996). Clopidogrel führt jedoch zu einer besseren CD62P-Blockade als ASS oder GPIIb/IIIa-Antagonisten (Klinkhardt et al. 2002).

NO-Donatoren sind bisher kaum darauf untersucht worden, ob sie die Agonist-induzierte CD62P-Expression oder die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Aggregaten hemmen können. Für inhaliertes NO ist bekannt, dass es die CD62P-Expression vermindern kann (Gries et al. 2000).

In unseren Versuchen zeigte sich im PRP eine starke Hemmung der CD62P-Expression mit einer maximaler Hemmung von 90-95%. Die CD62P-Expression wurde um den Faktor 10 empfindlicher gehemmt als die unter gleichen Bedingungen parallel gemessene Aggregation. Im Gegensatz dazu zeigt sich im Vollblut nur bei der höchsten Konzentration von 100µM eine Hemmung der CD62P-Expression von knapp 20%. Bei den im Vollblut bestimmten Plättchen-Leukozyten-Konjugaten war keinerlei Wirkung durch 4-MEPI-NO feststellbar.

Die beobachtete schlechte Wirkung im Vollblut trotz sehr guter Hemmung der CD62P-Expression im PRP ist wahrscheinlich durch einen Wirkungsverlust des freigesetzten NO im Vollblut bedingt. Prinzipiell sollte in Abwesenheit von Hämoglobin auch die Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten gut unterdrückt werden, da diese hauptsächlich über CD62P vermittelt werden, allerdings scheint der Parameter Plättchen-Leukozyten-Konjugate weniger empfindlich auf NO zu reagieren, da immerhin 20% der CD62P-Expression unterdrückt waren, jedoch keine Wirkung auf die Plättchen-Leukozyten-Konjugate zu verzeichnen war. Diese Beobachtung befindet sich in Übereinstimmung mit Publikationen, die Plättchen-Monozyten-Konjugate im Vergleich mit CD62P als empfindlicheren Parameter gegenüber Stimuli ausweisen (Michelson et al. 2001).

Möglicherweise sind auch die Versuchsbedingungen verantwortlich. In der Literatur werden bei Verwendung einer vergleichbaren Methode die Basalwerte der Konjugatbildung (bei Messung sofort nach Blutabnahme) bei Plättchen-Monozyten-Konjugaten mit 20-30% angegeben, bei Plättchen-Granulozyten-Konjugaten mit 10-15% (Redlich et al. 1997). Bereits durch die Aufbereitungsprozedur, bei der auch die Kontrollansätze geschüttelt wurden, bildeten sich offenbar viele Konjugate, was auch die Inkubation mit 4-MEPI-NO nicht verhindern konnte. Durch die Collagenstimulation nahm nur noch die Beladung der Monozyten mit Plättchen zu - entsprechend der Zunahme der durchschnittlichen Fluoreszenz pro Konjugat.

Nebenbei zeigte sich als interessante Beobachtung, dass im Vollblut die CD62P-Expression als Antwort auf Collagen stärker ausgeprägt war als im PRP. Dieses Phänomen könnte durch die Anwesenheit von Leukozyten bedingt sein, die bei der Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten die Plättchenaktivierung verstärken. Die Anwesenheit von Leukozyten in PRP verstärkt ebenfalls die Aggregation (Faraday et al. 2001) und durch

CD62P-Blockade und damit Unterbindung der Bildung von Plättchen-Leukozyten-Konjugate wird die TXA₂-Ausschüttung verringert (Faraday et al. 2001), sodass die Verstärkung der Aktivierungsreaktion eingeschränkt sein könnte.

Die Wirkung von NO-Donatoren auf die CD62P-Expression und die Formierung von Plättchen-Leukozyten-Konjugaten ist bisher kaum untersucht.

Langford et al. konnten zeigen, dass bei akutem Myokardinfarkt durch i.v.-Infusion von GSNO oder Glyzeroltrinitrat die Anzahl der CD62P-positiven Plättchen *in vivo* gesenkt werden konnte (Langford et al. 1996). Gries et al. (2000) konnten nach Inhalation von NO *ex vivo* im Vollblut eine Verminderung der ADP-induzierten CD62P-Expression konzentrationsabhängig um 15 bis 30 Prozent nachweisen. Sie verwendeten jedoch mit 2 µM eine deutlich niedrigere ADP-Konzentration als in unseren Versuchen. Zum Abschluss der vorliegenden Arbeit waren jedoch keine Untersuchungen bekannt, die für NO-Donatoren und speziell Diazeniumdiolate Daten zu IC₅₀-Werten, Maximalwerten oder Vergleiche zwischen CD62P-Expression und Aggregation liefern.

Mit dieser Arbeit werden erstmals Daten geliefert für den Einfluss eines NO-Donators auf die Collagen-induzierte CD62P-Expression mit IC₅₀-Werten und Maximalwerten der Hemmung. Die beobachtete potente Hemmung der CD62P-Expression im PRP gibt einen Hinweis auf eine anti-inflammatorische Wirkkomponente von 4-MEPI-NO.

Die empfindlichere Hemmung der CD62P-Expression im Vergleich zur Aggregation könnte zur beobachteten besseren Hemmung der Makroaggregatbildung im Vergleich zur Mikroaggregatbildung beitragen, da die Makroaggregatbildung bzw. die Stabilisierung großer Aggregate von CD62P abhängig ist (Merten und Thiagarani 2000).

Die Versuchsansätze für Aggregation und CD62P-Expression unterschieden sich durch die Zugabe von Eptifibatid zur Verhinderung der Aggregation bei der Messung der CD62P-Expression. Es ist nicht auszuschließen, dass die empfindlichere Hemmung der CD62P-Expression ein Artefakt durch den Zusatz von Eptifibatid darstellt. So könnte durch Bindung von GPIIb/IIIa-Antagonisten an den GPIIb/IIIa-Rezeptor durch „outside-in-signaling“ die Freisetzung von Granulainhaltsstoffen beeinträchtigt und damit die Aktivierungsreaktion vermindert sein (Storey et al. 1998). Matzdorff et al. (2001) konnten jedoch zeigen, dass Eptifibatid allein nicht zu einer Verringerung der CD62P-Expression führt, sondern bei hoher Dosis eher die Zahl CD62P-positiver Plättchen erhöht. Bei der Kombination von NO mit Eptifibatid kann allerdings eine Verstärkung der NO-Wirkung durch Eptifibatid nicht ausgeschlossen werden.

4-MEPI-NO stellte sich im PRP als potenter Inhibitor der Aggregation und der CD62P-Expression dar, zeigte jedoch im Vollblut nur eine geringe Hemmung der CD62P-Expression. Vor diesem Hintergrund schließt sich die Frage an, in welchem Maß die Aggregation im Vollblut durch 4-MEPI-NO gehemmt werden kann.

Hämoglobin stellt ein Hindernis für die Wirkung von NO im Vollblut dar, da NO mit sehr hoher Affinität an Hämoglobin bindet. Während die HWZ von NO in Phosphatpuffer etwa 4 Minuten beträgt, sinkt sie im Vollblut in den Bereich von Millisekunden ab (Liu et al. 1998).

Trotzdem existieren Hinweise, dass NO-Donatoren im Vollblut Wirksamkeit entfalten können. So ist bei Inhalation von NO eine Beeinträchtigung der Plättchenfunktion, bestimmt durch Aggregation oder CD62P-Expression, systemisch nachweisbar (Gries et al. 2000, Beghetti et al. 2003). Zur Zeit werden kontroverse Diskussionen über die Interaktion zwischen Hämoglobin und NO geführt. Gow und Stamler (1998) stellten die Theorie auf, dass NO durch Hämoglobin als β -cys93-nitrosyl-Hämoglobin konserviert wird, und an Orten niedriger Sauerstoffspannung wieder abgegeben werden kann. Ob Hämoglobin in vivo jedoch eher dem NO-Abbau oder doch als NO-Speicher und -Transporter dient, ist bisher nicht geklärt.

Die Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO wurde mit dem Durchflusszytometer vergleichend im Vollblut und im PRP bestimmt. Im PRP zeigte sich nach 10-minütiger Inkubation eine gute Hemmung der Aggregation. Die maximale Hemmung betrug etwa 95%, der IC₅₀-Wert 10 μ M. Im Vollblut war bei gleichen Bedingungen keine relevante Hemmung der Aggregation zu verzeichnen. Nur bei der höchsten Konzentration von 100 μ M ließ sich eine geringe, aber signifikante Hemmung von etwa 5 % feststellen. Dies könnte als Hinweis darauf gewertet werden, dass bei noch höheren, allerdings pharmakologisch nicht mehr relevanten Konzentrationen eventuell bessere Hemmungen zu erzielen sein könnten.

Bisher existieren nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Plättchen-Wirksamkeit von NO-Donatoren im Vollblut in vitro beschäftigt haben.

Megson et al. (2000) untersuchten zwei S-Nitrosothiole auf Wirksamkeit im Vollblut in vitro. Sie fanden mit den unsrigen vergleichbare Ergebnisse: Bei guter Hemmung der Aggregation im PRP durch beide S-Nitrosothiole verzeichneten sie eine aufgehobener Wirkung im Vollblut. Sogo et al. (2000) untersuchten die Hemmung der Plättchenaggregation in vitro durch GTN, SNP, GSNO und das Diazeniumdiolat DEA/NO. Sie stellten fest, dass Hämoglobin die Wirkung aller untersuchten NO-Donatoren auf die Aggregation aufhob, außer bei hohen Konzentrationen von DEA/NO. Hier zeigte sich eine Restwirkung, als deren Ursache die Autoren eine ausgelastete NO-Bindungskapazität des Hämoglobin diskutierten

(Sogo et al. 2000). Auch diese Ergebnisse sind mit den unsrigen vergleichbar, da 4-MEPI-NO ebenso wie DEA/NO eine geringe Restwirkung im Vollblut zeigte.

In vitro und unter diesen Bedingungen war keine relevante Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO im Vollblut zu verzeichnen. Es ist jedoch unklar, in wie weit die Ergebnisse auf die Situation in vivo übertragbar sind. So konnte für GSNO - trotz der vergleichbaren Ergebnisse mit aufgehobener Wirkung bei Inkubation im Vollblut *in vitro* - in anderen Studien eine Wirksamkeit von GSNO auf die Plättchenaktivierung *in vivo* gezeigt werden. Beispielsweise stellten Langford et al. (1996) bei Infusionen von GSNO eine reduzierte Plättchenaktivierung bei akutem Myokardinfarkt und instabiler Angina pectoris fest.

Bei der Bestimmung der Aggregation mittels Durchflusszytometer handelt es sich um eine relativ neue Methode (Fox et al. 2004). Da im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Aggregation sowohl mit dem Durchflusszytometer als auch mit dem Aggregometer bestimmt wurde, sollte ein Vergleich beider Methoden durchgeführt werden, um zu prüfen, ob die Methoden zu ähnlichen Ergebnissen führen.

Dazu wurde pro Proband parallel die Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO im PRP mit dem Aggregometer und mit dem Durchflusszytometer bestimmt.

Im Vergleich ergaben sich fast identische Werte für die IC₅₀. Die Werte der maximalen Hemmung unterschieden sich um etwa 20%-Punkte, wobei im Durchflusszytometer eine nahe 100%ige Hemmung gemessen wurde, im Aggregometer nur eine nahe 80%ige Hemmung.

Das Ergebnis ist etwas überraschend, da im Durchflusszytometer durch die Detektion von Mikroaggregaten eine geringere maximale Hemmung zu erwarten gewesen wäre.

Möglicherweise ist dieses Ergebnis jedoch teilweise durch die messtechnische Unterschiede verursacht. Im Durchflusszytometer ist die Standardabweichung der Messergebnisse größer als im Aggregometer, einzelne Messergebnisse schwanken stärker (z.B. die für die Berechnung wichtigen Negativ- und Positivkontrollen). Damit wurden teilweise auch über 100%ige Hemmungen berechnet, die in der Summe dann eventuell das höhere Maximalergebnis verursachten. Pharmakologisch relevant zur Beurteilung der Wirksamkeit ist jedoch hauptsächlich die IC₅₀, für die beide Messmethoden nahezu identische Werte ergaben.

Beim Vergleich der Hemmung der Aggregation bei den zuerst durchgeführten Versuchen (Hemmung der Aggregation im PRP nach unterschiedlichen Inkubationszeiten, 5.1.1) mit den später durchgeführten Versuchen zum Vergleich zwischen Hemmung der Aggregation und CD62P-Expression (5.1.3 und 5.1.4) fielen deutlich höhere IC₅₀-Werte bei den letzteren Versuchen auf.

Verschiedene Ursachen sind als Erklärung denkbar. Die Unterschiede könnten zum einen durch den Einfluss der interindividuellen Variabilität der Probanden in den relativ kleinen Gruppen zustande gekommen sein. Zum anderen könnte eine Alterung der Substanz 4-MEPI-NO für die geringere Wirksamkeit bei den später durchgeführten Versuchen verantwortlich sein.

Aus den vorangegangenen Versuchen zur Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO im Vollblut ergab sich die Frage, ob der Wirkungsverlust von 4-MEPI-NO reversibel ist, also ob nach Entfernung der Erythrozyten wieder eine Wirksamkeit vorhanden ist, oder ob 4-MEPI-NO durch Erythrozyten vollständig inaktiviert wird. Im Zusammenhang mit diesen Versuchen sollte auch die Frage nach der Wirksamkeit von 4-MEPI-NO nach langen Inkubationszeiten im PRP geklärt werden, da bei den Versuchen mit Inkubationszeiten bis zu 12 min keine signifikanten Unterschiede zu sehen waren.

Dazu wurde Vollblut mit 4-MEPI-NO inkubiert. Nach Inkubationszeiten zwischen 5 und 45 Minuten wurden die Erythrozyten durch Zentrifugation entfernt und die Aggregation wurde im PRP ausgelöst. Die Hemmung der Aggregation nach Inkubation im Vollblut wurde mit der Hemmung der Aggregation nach ebenso langer Gesamtinkubation im PRP verglichen.

Die Ergebnisse waren in zweierlei Hinsicht überraschend. Erstens war trotz der geringen HWZ von 4-MEPI-NO von 105 s (im Phosphatpuffer) die Wirksamkeit auch nach 75 minütiger Inkubation nicht abgeschwächt. Zweitens wurde durch Inkubation im Vollblut die Hemmung der Aggregation nicht signifikant abgeschwächt.

Als Erklärung für die lange Wirkdauer im PRP sind zwei Ursachen denkbar.

Entweder hält die NO-Wirkung in den Plättchen entsprechend lange an, oder NO wird im Plasma konserviert. Zur Klärung dieser Frage wurden Plasmatauschexperimente durchgeführt:

In einem ersten Versuch wurde PRP mit 4-MEPI-NO inkubiert, die Plättchen wurden abgetrennt und resuspendiert in unbehandeltem PPP oder 4-MEPI-NO-inkubiertem PPP.

In einem zweiten Versuch wurden aus unbehandeltem PRP die Plättchen abgetrennt und resuspendiert in unbehandeltem PPP oder 4-MEPI-NO-inkubiertem PPP.

Bei beiden Versuchen wurde anschließend die Aggregation mit ADP ausgelöst. Als Kontrolle diente die Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO im PRP.

Im PRP führte 4-MEPI-NO wie erwartet zu einer Hemmung der Aggregation. Bei Resuspendierung von Plättchen in PPP zeigte sich, dass die Wirkung von 4-MEPI-NO durch 4-MEPI-NO-inkubiertes PPP hergestellt werden konnte. Wurden jedoch aus Plättchen, die aus

4-MEPI-NO-inkubierten PRP gewonnen wurden, in unbehandeltem PPP resuspendiert, war die Hemmung der Aggregation stark abgeschwächt.

Es ist daher davon auszugehen, dass der Effekt von NO in den Plättchen nicht lange anhält. Vielmehr scheint die Langzeitwirkung von 4-MEPI-NO von Plasmakomponenten abhängig zu sein.

Eine wahrscheinliche Erklärung dieses Phänomens stellt die Nitrosylierung von Plasmaproteinen und/oder von niedrigmolekularen Thiolen wie Glutathion oder Cystein dar.

Nitrosylierungsreaktionen finden hauptsächlich an freien Thiolgruppen statt (Simon et al. 1996). Die nitrosylierten Proteine besitzen NO-ähnliche Wirkung, die mit dem Grad der Nitrosylierung zunimmt (Simon et al. 1996). Im Gegensatz zum kurzlebigen Radikal NO sind S-Nitrosoproteine relativ langlebig, da das gebundene NO weniger reaktiv und damit weniger anfällig für Reaktionen mit Sauerstoffspezies ist (Simon et al. 1996). Der größte Teil des NO wird an Albumin gebunden (Ewing et al. 1997, Crane et al. 2002, Rassaf et al. 2002), das somit als Speicher für NO fungieren könnte.

Die Bildung von nitrosylierten Proteinen und niedermolekularen S-Nitrosothiolen wurde von verschiedenen Autoren als Erklärung für die systemische Wirkung von inhaliertem NO vorgeschlagen (Megson et al. 2000, Wallis 2005). S-Nitrosothiole (RSNO) spielen möglicherweise auch physiologisch eine Rolle als NO-Donatoren. Es wurden relevante Spiegel im nano- bis mikromolaren Bereich im Plasma nachgewiesen (Rossi et al. 2001, Wallis 2005).

Rassaf et al. (2002) untersuchten den NO-Metabolismus im Plasma und Blut. Die HWZ von NO im Plasma in vitro betrug 68 s. In vitro ging die Gabe von NO mit der Bildung von Nitrit und RSNO, hauptsächlich in Form von hochmolekularen RSNO, im mikromolaren Bereich einher. Die Bildung der RSNO setzte sofort nach NO-Gabe ein, maximale Spiegel wurden innerhalb von 5 Minuten erreicht. Bei Anwesenheit von Erythrozyten war die RSNO-Bildung vermindert. In vivo bei gesunden Probanden konnten Rassaf et al. (2002) bei der intravenösen Infusion von NO die Bildung von RSNO im nanomolaren Bereich zeigen, erhöhte RSNO-Spiegel waren dabei auch am kontralateralen Arm messbar.

Crane et al. (2002) untersuchten eine mögliche Wirkungsverlängerung des Diazeniumdiolates DEA/NO durch Plasmakomponenten. DEA/NO liegt mit einer HWZ von 2 min (Fitzhugh und Keefer 2000) etwa im gleichen Bereich wie 4-MEPI-NO. Sie stellten fest, dass trotz der kurzen HWZ von 2 min auch nach 30 min Vorinkubation noch eine wirksame Hemmung der Plättchenaggregation im PRP erzielt werden konnte, obwohl bereits nach 20 min Inkubation kein freies NO mehr nachweisbar war. Im Gegensatz dazu war bei gewaschenen Plättchen,

also in Abwesenheit von Plasma, diese Wirkungsverlängerung nicht vorhanden. Durch Zugabe von humanem Serumalbumin konnte der Effekt teilweise wiederhergestellt werden, durch Zugabe von humanem Serumalbumin und niedermolekularen Thiolen wie Glutathion, Cystein oder Cysteinyl-Glycin war der Effekt vollständig wiederhergestellt. Die Bildung von S-Nitrosothiolen war nachweisbar. Bei Anwesenheit niedermolekularer Thiole jedoch in Abwesenheit von Albumin war kein Effekt vorhanden. Es wurde der Nachweis geführt, dass die Effekte auf die Plättchenaggregation komplett NO-vermittelt waren (Crane et al. 2002).

Crane et al. (2002) postulieren, dass S-Nitrosoalbumin selbst eine schwache Anti-Plättchen-Wirksamkeit aufweist, die Wirkung aber durch niedermolekulare Thiole potenziert wird, dass also niedermolekulare Thiole eine wichtige Rolle bei der Bildung und Aktivierung eines S-Nitrosoalbumin-Reservoirs spielen, welches die Wirksamkeit von NO deutlich verlängert.

Unsere Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Arbeit von Crane et al. (2002). Crane et al. haben einen Zeitraum von 30 min untersucht. Ergänzend dazu weisen die eigenen Ergebnisse für 4-MEPI-NO eine noch weiter gehende Verlängerung der Wirksamkeit im Bereich von 30 bis zu 75 min nach.

Beide bisher auf diese Fragestellung untersuchten Substanzen sind Diazeniumdiolate. Es ist nicht bekannt, ob nur bei Diazeniumdiolaten diese Verlängerung der Wirksamkeit vorkommt, oder ob dies auch bei anderen NO-Donatoren mit anderen Freisetzungsmechanismen möglich ist. Denkbar wäre, dass nur bei extrazellulärer NO-Freisetzung in ausreichendem Maße Nitrosylierungsreaktionen an Plasmaproteinen und Thiolen stattfinden, so dass ausreichend hohe S-Nitrosothiol-Spiegel gebildet werden, um Plättchen effektiv hemmen zu können. NO-Donatoren mit intrazellulärer Freisetzung oder solche die eine intrazelluläre Bioaktivierung benötigen, könnten dann diese Effekte nicht erzielen. Zur Klärung dieser Frage könnten entsprechende Plasmaaustauschversuche durchgeführt werden.

Unerwartet war die erhaltene Wirksamkeit nach Inkubation im Vollblut. In einer kürzlich erschienenen Publikation konnte dieses Ergebnis nachvollzogen werden (Abuo-Rahma et al. 2005). Hämoglobin bindet NO sehr rasch. Während in physiologischer Lösung ohne Hämoglobin die HWZ von NO etwa 4 min beträgt, liegt sie im Vollblut nur bei etwa 1,8 ms (Liu et al. 1998). Die HWZ von 4-MEPI-NO seinerseits beträgt 105 s, die Inkubationszeiten im Vollblut lagen aber zwischen 5 und 45 min. Trotz der also anzunehmenden sehr kurzen HWZ im Vollblut zeigte sich jedoch - im Vergleich zur Wirksamkeit nach Inkubation im PRP - keine eingeschränkte Wirksamkeit nach Entfernung der Erythrozyten.

Mögliche Erklärungen sind:

- Die NO-Produktion ist hoch genug, um trotz der schnellen Bindung an Hämoglobin eine ausreichende Nitrosylierung von Plasmaproteinen und -thiolen zu ermöglichen, sodass genügend hohe NO-Konzentrationen zur Hemmung der Plättchenaggregation nach Entfernung der Erythrozyten erreicht werden. So konnten Rassaf et al. (2000) zeigen, dass bei Anwesenheit von Erythrozyten die RSNO-Bildung zwar reduziert aber nicht aufgehoben ist. Die systemische Erhöhung der RSNO-Spiegel durch Infusion von NO wurde in vivo, also im Vollblut beobachtet (Rassaf et al. 2002).
- Erythrozyten und Hämoglobin sind in einen NO-Speicherprozess involviert und geben nach der raschen Bindung NO an Albumin wieder ab, z.B. über niedermolekulare Thiole wie Glutathion (Gow und Stamler 1998).
- Möglicherweise sind bei Langzeitinkubation auch niedrigere NO-Spiegel wirksam. Diese Möglichkeit ist jedoch unwahrscheinlich aufgrund der stabil vorhandenen Unterschiede bei den verwendeten Konzentrationen von 10 μ M und 30 μ M.
- Die S-Nitrosothiole könnten niedrigere IC₅₀-Werten als die Ausgangssubstanz 4-MEPI-NO aufweisen.
- 4-MEPI-NO wird im Vollblut stabilisiert und gibt nur bei Abwesenheit der Erythrozyten NO ab (eher unwahrscheinlich).

Zur Klärung könnte eine Quantifizierung von Nitrosoalbumin und S-Nitrosothiolen nach Inkubation mit 4-MEPI-NO im Vollblut im Vergleich zur Inkubation im PRP durchgeführt werden (Simon et al. 1996, Ewing et al. 1997)..

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass trotz der geringen physikalischen HWZ von 4-MEPI-NO Langzeiteffekte erzielt werden können, wahrscheinlich durch die Bildung eines Plasmareservoirs in Form von S-Nitrosothiolen (Crane et al. 2002).

Die Beobachtung, dass 4-MEPI-NO nach Entzug der Erythrozyten wieder wirksam wird, hat Bedeutung für den Einsatz als Plättchen-hemmenden Wirkstoff in vivo. Trotz der Anwesenheit von Erythrozyten können möglicherweise NO-Reservoirs im Plasma gebildet werden. Denkbar ist auch, dass Erythrozyten und Hämoglobin nicht nur dem NO-Abbau dienen, sondern in einen NO-Speicherprozess involviert sind (Gow und Stamler 1998, Wallis 2005). Auf diese Weise könnte trotz eingeschränkter Wirkung im Vollblut in Erythrozyten-armen Gebieten wie an der Endothelgrenze (Aarts et al. 1988) eine Plättchenhemmung erzielt werden.

Schließlich sollte im Rahmen dieser Arbeit die Signaltransduktion durch 4-MEPI-NO untersucht werden. NO stimuliert die Guanylatzyklase zur Umsetzung von GTP zu cGMP, welches einen wichtigen second-messenger der Signaltransduktion durch NO darstellt. Mit der Einführung der Substanz ODQ als selektivem Inhibitor der NO-sensitiven Guanylatzyklase (Garthwaite et al. 1995) ergaben sich neue Möglichkeiten zur Untersuchung der Signaltransduktion durch NO und der Rolle der Guanylatzyklase. Verschiedene NO-Donatoren weisen in ihrer Wirksamkeit unterschiedliche Abhängigkeiten von der Guanylatzyklase auf. So stellten 1998 Gordge et al. (1998) bei der Untersuchung eines S-Nitrosothiols (S-Nitrosogluthathion) cGMP-unabhängige Komponenten in der Wirkung auf die Plättchenaggregation fest. Für SNP hingegen ist bekannt, dass die Wirkung fast ausschließlich cGMP-vermittelt ist (Sogo et al. 2000). SNP wurde daher als Vergleichssubstanz für die Versuche mit 4-MEPI-NO ausgewählt.

Bei unseren Versuchen war nach Vorinkubation mit ODQ die Hemmung der Aggregation durch SNP fast komplett aufgehoben. Bei der Hemmung der Aggregation durch 4-MEPI-NO zeigte sich kein signifikanter Einfluss durch ODQ. Sowohl 4-MEPI-NO als auch SNP führten zu einem Anstieg des cGMP-Spiegels, wobei der Anstieg bei 4-MEPI-NO stärker ausgeprägt war. Im ELISA konnte eine fast vollständige Suppression der cGMP-Produktion nach Inkubation mit ODQ sowohl bei 4-MEPI-NO als auch bei SNP nachgewiesen werden.

Obwohl also 4-MEPI-NO eine Stimulierung der Guanylatzyklase mit Anstieg der cGMP-Spiegel bewirkt, ist die Hemmung der Plättchenaggregation durch 4-MEPI-NO unabhängig von der Guanylatzyklase und einer cGMP-Freisetzung uneingeschränkt möglich. Die bereits bekannte Abhängigkeit der SNP-Wirkung von der Guanylatzyklase hat sich in den Versuchen bestätigt.

Bisher haben sich verschiedene Arbeitsgruppen mit der Frage nach cGMP-unabhängigen Mechanismen bei Diazeniumdiolaten beschäftigt, wobei die Ergebnisse uneinheitlich sind.

Homer und Wanstall (2002) untersuchten den Effekt des Diazeniumdiolates MAHMA-NONOat auf die Aggregation von Plättchen der Ratte. Sie stellten bei Vorinkubation mit ODQ eine signifikante, jedoch schmale parallele Verringerung der Dosis-Wirkungskurve fest. Die aggregationshemmende Wirkung war weitgehend ODQ-resistent (Homer und Wanstall 2002). Die Ergebnisse für 4-MEPI-NO stehen damit in Übereinstimmung mit den Arbeiten von Homer und Wanstall, wobei bei 4-MEPI-NO durch ODQ tendenziell ebenfalls einen parallelen, schmalen Wirkungsverlust erfuhr, der jedoch nicht signifikant war. Im Gegensatz dazu stellten Gordge et al. (1998) bei dem Diazeniumdiolat DEA/NO eine signifikant

verringerte Hemmung der Plättchenaggregation unter Einfluss von ODQ fest, bei deutlicher paralleler Rechtsverschiebung der Inhibitions-Kurve um mehr als eine Potenz.

Ebenso fanden Abuo-Rahma et al. (2005) bei ihren Untersuchungen mehrerer Diazeniumdiolate eine signifikant verminderte Hemmung der Aggregation unter Einfluss von ODQ. Der Effekt von ODQ auf die Hemmung der Aggregation war jedoch geringer ausgeprägt als der ebenfalls untersuchte Effekt auf den Gefäßtonus; die durch die Diazeniumdiolate bewirkte Vasorelaxation wurde durch ODQ deutlich stärker vermindert (Abuo-Rahma et al. 2005). Dieses Ergebnis kann als ein Hinweis auf Unterschiede in der Enzymausstattung zwischen Plättchen und glatten Muskelzellen gewertet werden.

Die Arbeitsgruppe um Homer untersuchte mehrere NO-Donatoren hinsichtlich der cGMP-Abhängigkeit ihrer NO-vermittelten Vasorelaxation an der Pulmonalarterie der Ratte und stellte fest, dass durch ODQ die Wirkung von GTN, Isosorbitdinitrat und SNP fast komplett verhindert wurde, während Diazeniumdiolate und das Sydnomin Linsidomin weiterhin wirksam waren. Diese Unterschiede führten sie auf den Ort der NO-Produktion zurück: GTN, Isosorbitdinitrat und SNP benötigen Gewebeaktivierung und werden im Zellinneren freigesetzt, Linsidomin und Diazeniumdiolate setzten spontan NO oder NO-Derivate außerhalb der Zelle frei (Homer et al. 1999).

In einer kürzlich erschienenen Publikation von Crane et al. (2005) wird die Theorie gestützt, dass die extrazelluläre NO-Produktion entscheidend ist für cGMP-unabhängige Mechanismen der NO-Wirkung. Crane et al. (2005) untersuchten DEA/NO, SNVP (ein S-Nitrosothiol) und SIN-1 (Linsidomin). DEA/NO war in seiner Wirkung im PRP komplett ODQ-resistent und war als einzige der untersuchten Substanzen in der Lage, auch in gewaschenen Plättchen, also in Abwesenheit von Plasmafaktoren, cGMP-unabhängige Effekte zu erzielen. Crane et al. unterstützen damit die These, dass die extrazelluläre NO-Freisetzung zu cGMP-unabhängigen Effekten auf die Ca^{2+} -Mobilisierung führt, während eine intrazelluläre NO-Produktion nur cGMP-abhängige Effekte erlaubt.

Die Guanylatzyklase im Zytoplasma hat eine hohe Affinität für NO (Crane et al. 2005, Mo et al. 2004). Intrazellulär gebildetes NO bindet daher hauptsächlich an die Guanylatzyklase. Extrazellulär gebildetes NO beeinflusst eher direkt oder über Interaktion mit Thiolen an der Plättchenoberfläche membranständige Proteine oder in der Nähe der Zellmembran gelegene Proteine wie zum Beispiel die SERCA (sarkoplasmatische Ca^{2+} -ATPase), die im „dense tubular system“ in der Nähe zur Zellmembran gelegen ist (Crane et al. 2005).

Als mögliche Mechanismen der cGMP-unabhängigen Wirkung werden angeführt: Hemmung der TxA_2 -Synthese durch S-Nitrosothiolen (Crane et al. 2005), Funktionsänderungen von

Proteinen durch S-Nitrosylierung (Wallis 2005), vor allem aber eine Kontrolle der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration über eine Aktivierung der SERCA (Crane et al. 2005, Homer und Wanstall 2002). Diese Annahme wird durch die Versuche von Homer und Wanstall (2002) gestützt, die zeigen konnten, dass der SERCA-Inhibitor Thapsigargin die cGMP-unabhängigen Effekte des Diazeniumdiolats MAHMA-NONOat an Plättchen hemmen konnte.

Die Bedeutung cGMP-unabhängiger Mechanismen für die Klinik ist nicht geklärt. Eine Desensitivierung der Guanylatzyklase tritt beispielsweise beim akuten Myokardinfarkt auf (Pistono et al. 2002). Möglicherweise spielt die Desensitivierung der Guanylatzyklase auch bei der Entstehung der Nitrattoleranz eine Rolle (Wang et al. 2002, Yamamoto und Bing 2000), sodass cGMP-unabhängige Mechanismen mit einer fehlenden Toleranzentwicklung verbunden sein könnten.

4-MEPI-NO verfügt neben der stimulierenden Wirkung auf die Guanylatzyklase auch über cGMP-unabhängige Wirkmechanismen, welche trotz Hemmung der Guanylatzyklase eine vollständig erhaltene Wirkung auf die Plättchenaggregation erlauben. Andere Arbeitsgruppen haben bei Diazeniumdiolaten ebenfalls zumindest cGMP-unabhängige Teileffekte gefunden (Homer und Wanstall 2002, Gordge et al. 1998, Abuo-Rahma et al. 2005), oder konnten unser Ergebnis bestätigen (Crane et al. 2005). Bei cGMP-unabhängigen Effekten scheint es sich also um eine typische Eigenschaft der Diazeniumdiolate zu handeln, die mit ihrer Befähigung zur extrazellulären NO-Freisetzung in Zusammenhang stehen dürfte.

7. Schlussfolgerungen

Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung des Diazeniumdiolates 4-MEPI-NO hinsichtlich seiner Wirksamkeit auf Plättchenaggregation und Plättchenaktivierung. Daneben sollten Aussagen zur Wirksamkeit in An- und Abwesenheit von Erythrozyten, zur Dauer der Wirkung in physiologischen Medien wie PRP und Vollblut sowie zur Bedeutung der Guanylatzyklase für die Hemmung der Plättchenfunktion durch 4-MEPI-NO getroffen werden.

4-MEPI-NO bewirkte eine potente Hemmung der Aggregation und CD62P-Expression im PRP, wobei eine empfindlichere Hemmung der CD62P-Expression im Vergleich zur Aggregation zu beobachten war. 4-MEPI-NO könnte damit auch über eine anti-inflammatorische Wirkkomponente verfügen. Die Bildung von Mikroaggregaten konnte wirksam gehemmt werden. Allerdings waren im Vergleich zur Makroaggregation höhere Dosen notwendig und die Hemmung war nicht vollständig möglich.

Im Vollblut war bei den durchgeführten Versuchen *in vitro* weder eine relevante Hemmung der Aggregation noch der CD62P-Expression feststellbar. Der Wirkungsverlust ist wahrscheinlich durch eine Bindung von freigesetztem NO an Hämoglobin bedingt.

Die beobachtete lange Wirksamkeit trotz geringer physikalischer HWZ ist vermutlich auf die Nitrosylierung von Plasmaproteinen oder Plasmathiolen zurückzuführen. Überraschend und ungeklärt ist die erhaltene Wirksamkeit nach Inkubation im Vollblut und Entfernung der Erythrozyten. Die Wirkung von 4-MEPI-NO ist ODQ-resistent, also unabhängig von cGMP möglich.

Aus den *in vitro* Versuchen ist nicht ohne weiteres eine Schlussfolgerung auf die Wirkung *in vivo* möglich. So zeigte die NO-freisetzende Substanz GSNO trotz aufgehobener Wirkung im Vollblut *in vitro* systemische Effekte auf die Plättchenaggregation *in vivo*. Zum möglichen Einsatz von 4-MEPI-NO als Medikament können daher auf Grundlage der derzeitigen Ergebnisse nur wenige Aussagen getroffen werden. Abschließend ist die Frage nach der Wirksamkeit von 4-MEPI-NO nur durch *in vivo* Versuche zu klären. Für die Beurteilung der Einsatzfähigkeit als Medikament sind daneben auch Kenntnisse über die Wirkung auf den Gefäßtonus notwendig.

8. Literaturverzeichnis

- Aarts PA, van den Broek SA, Prins GW, Kuiken GD, Sixma JJ, Heethaar RM. 1988. Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells in the center in flowing blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 8(6):819-824.
- Abuo-Rahma GEDAA, Horstmann A, Radwan MF, El-Emam A, Glusa E, Lehmann J. 2005. NO-donors, part 9(1): diazeniumdiolates inhibit human platelet aggregation and induce a transient vasodilatation of porcine pulmonary arteries in accordance with the NO-releasing rates. *European Journal of Medical Chemistry*, 40(3):281-7
- Alonso D, Radomski MW. 2003. Nitric oxide, platelet function, myocardial infarction and reperfusion therapies. *Heart Failure Reviews*, 8(1):47-54.
- Anderson TJ. 2003. Nitric oxide, atherosclerosis and the clinical relevance of endothelial dysfunction. *Heart Failure Reviews*, 8(1):71-86.
- André P. 2004. P-selectin in haemostasis. *British Journal of Haematology*, 126:298-306.
- Becker BF, Heindl B, Kupatt C, Zahler S. 2000. Endothelial function and hemostasis. *Zeitschrift für Kardiologie*, 89 (3):160-167.
- Beghetti M, Sparling C, Cox PN, Stephens D, Adatia I. 2003. Inhaled NO inhibits platelet aggregation and elevates plasma but not intraplatelet cGMP in healthy human volunteers. *American Journal of Heart Circulation Physiology*, 285(2):H637-642.
- Bertrand ME, Rupprecht HJ, Urban P, Gershlick AH, and for the CLASSICS Investigators. 2000. Double-blind study of the safety of clopidogrel with and without a loading dose in combination with aspirin compared with ticlopidine in combination with aspirin after coronary stenting: the clopidogrel aspirin stent international cooperative study. *Circulation*, 102(6):624-629.
- Born GVR. 1962. Aggregation of blood platelets by adenosindiphosphat and its reversal. *Nature*, 194:927-929.
- Caron A, Théoret J-F, Mousa SA, Merhi Y. 2002. Anti-platelet effects of GPIIb/IIIa and P-selectin antagonism, platelet activation, and binding to neutrophils. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 40(2):296-306.
- Crane MS, Ollosson R, Moores KP, Rossi AG, Megson IL. 2002. Novel role for low molecular weight plasma thiols in nitric oxide-mediated control of platelet function. *The Journal of Biochemical Chemistry*, 277 (49):46858-46863.
- Crane MS, Rossi AG, Megson IL. 2005. A potential role for extracellular nitric oxide generation in cGMP-independent inhibition of human platelet aggregation:

- biochemical and pharmacological considerations. *British Journal of Pharmacology*, 144(6): 849-59
- Ewing JF, Young DV, Janero DR, Garvey DS, Grinell TA. 1997. Nitrosylated bovine serum albumin derivatives as pharmacologically active nitric oxide congeners. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283 (2):947-954.
- Faraday N, Scharpf RB, Dodd JM, Martinez EA, Rosenfeld BA, Dorman T. 2001. Leukocytes can enhance platelet-mediated aggregation and thromboxane release via interaction of P-selectin glycoprotein ligand 1 with P-selectin. *Anesthesiology*, 94(1):145-151.
- Fitzhugh AL, Keefer LK. 2000. Diazeniumdiolates: pro- and antioxidant applications of the "NONOates". *Free Radical Biology and Medicine*, 28 (10):1463-1469.
- Fox C, Sasae R, Janson S, May JA, Heptinstall S. 2004. Quantitation of platelet aggregation and microaggregate formation in whole blood by flow cytometry. *Platelets*, 15 (2):85-93.
- Freedman JE, Loscalzo J. 2003. Nitric oxide and its relationship to thrombotic disorders. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(6):1183-1188.
- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. 2001. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signaling and cell adhesion. *Thrombosis and Haemostasis*, 86(1):214-221.
- Furman MI, Benoit SE, Barnard MR, Valeri CR, Borbone ML, Becker RC, Hechtman HB, Michelson AD. 1998. Increased platelet reactivity and circulating monocyte-platelet aggregates in patients with stable coronary artery disease. *Journal of the American College of Cardiology*, 31 (2):352-358.
- Gabbasov ZA, Popov EG, Gavrilov IY, Pozin EY. 1989. Platelet aggregation: the use of optical density fluctuations to study microaggregate formation. *Thrombosis Research*, 54(3):215-223
- Garthwaite J, Southam E, Boulton CL, Nielsen EB, Schmidt K, Mayer B. 1995. Potent and selective inhibition of nitric oxide-sensitive guanylyl cyclase by 1H-(1,2,4)Oxadiazolo(4,3-a)quinoxalin-1-one. *Molecular Pharmacology*, 48(2):184-188.
- Gasser RN, Dienstl F, Henn R. 1987. Impact of thromboischemic reentry mechanism of coronary thrombosis and microembolism in acute myocardial infarction. *Angiology*, 38 (7):562-567.
- Gawaz M. 1999. *Das Blutplättchen*. Stuttgart, Thieme Verlag.
- Gawaz M, Ruf A, Pogatsa-Murray G, Dickfeld T, Rüdiger S, Taubitz W, Fischer J, Müller I, Meier D, Patscheke H, Schömig A. 2000. Incomplete inhibition of platelet aggregation

- and glycoprotein IIb-IIIa receptor blockade by abciximab: importance of internal pool of glycoprotein IIb-IIIa receptors. *Thrombosis and Haemostasis*, 83(6):915-922.
- Gordge MP, Hothersall JS, Noronha-Dutra AA. 1998. Evidence for a cyclic GMP-independent mechanism in the anti-platelet action of S-nitrosoglutathione. *British Journal of Pharmacology*, 124(1):141-148.
- Gow AJ, Stamler JS. 1998. Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature*, 391(6663):169-173.
- Gries A, Herr A, Motsch J, Holzmann A, Weimann J, Taut F, Erbe N, Bode C, Martin E. 2000. Randomized, placebo-controlled, blinded and cross-matched study on the antiplatelet effect of inhaled nitric oxide in healthy volunteers. *Thrombosis and Haemostasis*, 83(2):309-315.
- Harrington RA, Kleiman NS, Granger CB, Ohman EM, Berkowitz SD. 1998. Relation between inhibition of platelet aggregation and clinical outcomes. *American Heart Journal*, 136(4Pt2Su):S43-50.
- Homer KL, Fiore SA, Wanstall JC. 1999. Inhibition by 1H-(1,2,4)oxadiazolo(4,3,-a)quinoxalin-1-one (ODQ) of responses to nitric oxide-donors in rat pulmonary artery: influence of the mechanism of nitric oxide generation. *Journal of Pharmaceutical Pharmacology*, 51(2):135-139.
- Homer KL, Wanstall JC. 2002. Inhibition of rat platelet aggregation by the diazeniumdiolate nitric oxide donor MAHMA NONOate. *British Journal of Pharmacology*, 137(7):1071 - 1081.
- Hothorn L, Lehmacher W. 1991. A simple testing procedure "Control versus k treatments" for one-sided ordered alternatives, with application in toxicology. *Biometrical Journal*, 33(2): 179-189
- Hu H, Li N, Yngen M, Östenson C-G, Wallén NH, Hjemdahl P. 2004. Enhanced leukocyte-platelet cross-talk in type 1 diabetes mellitus: relationship to microangiopathy. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(1): 58-64
- Huo Y, Ley KF. 2004. Role of platelets in the development of atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 14(1):18-22.
- Jackson SP, Nesbitt, W.S., Kulkarni, S. 2003. Signaling events underlying thrombus formation. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(7):1602-1612.
- Janero DR, Ewing JF. 2000. Nitric oxide and postangioplasty restenosis: pathological correlates and therapeutic potential. *Free Radical Biology and Medicine*, 29(12):1199-1221.

- Keefer LK. 2003. Progress toward clinical application of the nitric oxide-releasing diazeniumdiolates. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43:585-607.
- Klinkhardt U, Graff J, Harder S. 2002. Clopidogrel, but not abciximab, reduces platelet leukocyte conjugates and P-selectin expression in a human ex vivo in vitro model. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 71 (3):176-185.
- Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, Ravanat C, Freund M, Mangin P, Heel KA, Street A, Harper IS, Lanza F, Jackson SP. 2000. A revised model of platelet aggregation. *Journal of Clinical Investigation*, 105(6):783-791.
- Langford EJ, Wainwright RJ, Martin JF. 1996. Platelet activation in acute myocardial infarction and unstable angina is inhibited by nitric oxide donors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 16(1):51-55.
- Lefkovits J, Plow E, Topol EJ. 1995. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptors in cardiovascular medicine. *New England Journal of Medicine*, 332 (23):1553-1559.
- Li N, Hu H, Lindqvist M, Wikström-Jonsson E, Goodall AH, Hjemdahl P. 2000. Platelet-leukocyte cross talk in whole blood. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 20(12):2702-2708.
- Liu X, Miller MJS, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR. 1998. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (30):18709-18713.
- Loscalzo J. 2001. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circulation Research*, 88 (8):756-762.
- Matsuno H, Kozawa O, Nagashima S, Kanamaru M, Uematsu T. 1999. Comparative antiplatelet effects of aspirin, vapirost and GR144053, a GPIIb/IIIa antagonist, with special reference to the role of platelet microaggregates. *British Journal of Pharmacology*, 127(5):1129-1134.
- Matzdorff AC, Kühnel G, Kemkes-Matthes B, Voss R. 2001. Comparison of GPIIb/IIIa inhibitors and their activity as measured by aggregometry, flow cytometry, single platelet counting, and the rapid platelet function analyzer. *Journal of Thrombosis and Thrombolysis*, 12 (2):129-139.
- McBane RD, Karnicki K, Tahirkheli N, Miller RS, Owen WG. 2003. Platelet characteristics associated with coronary artery disease. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1(6):1296-1303.
- Megson IL, Sogo N, Mazzei F, Butler AR, Walton JC, Webb DJ. 2000. Inhibition of human platelet aggregation by a novel S-nitrosothiol is abolished by haemoglobin and red

- blood cells in vitro: implications for anti-thrombotic therapy. *British Journal of Pharmacology*, 131(7):1391-1398.
- Merten M, Thiagarajan P. 2000. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*, 102(16):1931-1936.
- Michelson AD, Barnard MR, Krueger LA, Valeri CR, Furman MI. 2001. Circulating monocyte-platelet aggregates are a more sensitive marker of in vivo platelet activation than platelet surface P-selectin. *Circulation*, 104(13):1533-1537.
- Miyamoto S, Kawano H, Sakamoto T, Soejima H, Kajiwarra I, Shimomura H, Kojima S, Hokamaki J, Sugiyama S, Hirai N, Yoshimura M, Ozaki Y, Ogawa H. 2003. Formation of platelet microaggregates correlates with adverse clinical outcome in patients with coronary artery disease. *Thrombosis and Haemostasis*, 89(4):681-686.
- Mo E, Amin H, Bianco IH, Garthwaite J. 2004. Kinetics of a cellular nitric oxide/cGMP/phosphodiesterase-5 pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(25):26149-26158.
- Münzel T, Daiber A, Mülsch A. 2005. Explaining the phenomenon of nitrate tolerance. *Circulation Research*, 97(7):618-628.
- O'Neill WW, Serruys P, Knudtson M, Van Es GA, Timmis GC, van der Zwaan C, Kleiman J, Gong J, Roecker EB, Dreiling R, Alexander J, Anders R for the EXCITE Trial Investigators. 2000. Long-term treatment with a platelet glycoprotein-receptor antagonist after percutaneous coronary revascularization. *New England Journal of Medicine*, 342(18):1316-1324.
- Parker JD, Parker JO. 1998. Nitrate therapy for stable angina pectoris. *New England Journal of Medicine*, 338 (8):520-531.
- Pistono M, Bergerone S, Carrieri L, Paglia I, Stefano D, Capizzi A, Ferri M, Pescarmona G, Bosia A, Trevi G. 2002. Platelet cyclic GMP levels in unstable angina and myocardial infarction. *Platelets*, 13(5-6):307-311.
- Rassaf T, Kleinbongard P, Preik M, Dejam A, Gharini P, Lauer T, Erckenbrecht J, Duschin A, Schulz R, Heusch G, Feelisch M, Kelm M. 2002. Plasma nitrosothiols contribute to the systemic vasodilator effects of intravenously applied NO: experimental and clinical study on the fate of NO in human blood. *Circulation Research*, 91(6):470-477.
- Rauch U, Osende JJ, Fuster V, Badimon JJ, Fayad Z, Chesebro JH. 2001. Thrombus formation on atherosclerotic plaques: pathogenesis and clinical consequences. *Annales of Internal Medicine*, 134(3):224-238.

- Redlich H, Vickers J, Lösche W, Heptinstall S, Kehrel B, Spangenberg P. 1997. Formation of platelet-leukocyte conjugates in whole blood. *Platelets*, 8(6):419-26
- Rossi R, Giustarini D, Milzani A, Colombo R, Dalle-Donne I, Di Simplicio P. 2001. Physiological levels of S-nitrosothiols in human plasma. *Circulation Research*, 89(12):E47.
- Schechter AN, Gladwin MT. 2003. Hemoglobin and the paracrin and endocrin functions of nitric oxide. *New England Journal of Medicine*, 348 (15):1483-1485.
- Scholz T, Zhao L, Temmler U, Bath P, Heptinstall S, Lösche W. 2002. The GPIIb/IIIa antagonist eptifibatide markedly potentiates platelet-leukocyte interaction and tissue factor expression following platelet activation in whole blood in vitro. *Platelets*, 13(7):401-406.
- Simon DI, Mullins ME, Jia L, Gaston B, Singel DJ, Stamler JS. 1996. Polynitrosylated proteins: characterization, bioactivity, and functional consequences. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93(10):4736-4741.
- Sogo N, Magid KS, Shaw CA, Webb DJ, Megson IL. 2000. Inhibition of human platelet aggregation by nitric oxide donor drugs: relative contribution of cGMP-independent mechanisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 279 (2):412-419.
- Storey RF, Wilcox RG, Heptinstall S. 1998. Differential effects of glycoprotein IIb/IIIa antagonists on platelet microaggregate and macroaggregate formation and effect of anticoagulant on antagonist potency - implications for assay methodology and comparison of different agonists. *Circulation*, 98 (16):1616-1621.
- Taylor A, Granger DN. 2003. Hypercholesterolemia promotes P-selectin-dependent platelet-endothelial cell adhesion in postcapillary venules. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*, 23(4):675-680.
- Topol EJ, Moliterno DJ, Herrmann HC, Powers ER, Grines CL, Cohen DJ, Cohen EA, Bertrand M, Neumann FJ, Stone GW, DiBattiste PM, Yakubov SJ, DeLucca PT, Demopoulos L, for the TARGET Investigators. 2001. Comparison of two platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibitors, tirofiban and abciximab, for the prevention of ischemic events with percutaneous coronary revascularization. *New England Journal of Medicine*, 344 (25):1888-1894.
- Vorchheimer DA, Becker R. 2006. Platelets in atherothrombosis. *Mayo Clinic Proceedings*, 81 (1):59-68.
- Wallis JP. 2005. Nitric oxide and blood: a Review. *Transfusion Medicine*, 15 (1):1-11.

- Wang PG, Xian M, Xiaoping T, Xuejun W, Wen Z, Cai T, Janczuk AJ 2002. Nitric oxide donors: chemical activities and biological applications. *Chemical Reviews*, 102 (4):1091-1134.
- Yamamoto T, Bing RJ 2000. Nitric oxide donors. *Society for Experimental Biology and Medicine*, 225(3):200-206.
- Yamazaki M, Uchiyama S., Iwata M. 2001. Measurement of platelet fibrinogen binding and P-selectin expression by flow cytometry in patients with cerebral infarction. *Thrombosis Research*, 104 (3):197-205.

9. Anhang

Vorträge

Schaarschmidt A, Konter J, Reiss S, Oberle V, Claus RA, Glusa E, Lehmann J, Lösche W. Guanylyl cyclase-independent and plasma-dependent inhibition of platelet aggregation by diazeniumdiolate. XXth European Platelet Meeting, Ede (the Netherlands), 13 - 15 October 2005.

Schaarschmidt A, Konter J, Reiss S, Oberle V, Claus RA, Glusa E, Lehmann J, Lösche W. Guanylyl cyclase-independent and plasma-dependent inhibition of platelet aggregation by 4-methyl piperidine NONOate. 50. Jahrestagung der Gesellschaft für Thrombose- und Hämostaseforschung e.V., Basel (Schweiz), 15. – 18. Februar 2006.

Schaarschmidt A, Konter J, Reiss S, Oberle V, Claus RA, Glusa E, Lehmann J, Lösche W. Inhibition of platelet aggregation by 4-methyl piperidine NONOate is mediated by plasma factors but not by cGMP. Lodz Platelet Conference, Lodz (Poland), 25 – 28 June 2006.

Abstracts in wissenschaftlichen Zeitschriften

Schaarschmidt A, Konter J, Reiss S, Oberle V, Claus RA, Glusa E, Lehmann J, Lösche W. Guanylyl cyclase-independent and plasma-dependent inhibition of platelet aggregation by 4-methyl piperidine NONOate. Haemostaseologie 2006; 1: A43.

Schaarschmidt A, Konter J, Reiss S, Oberle V, Claus RA, Glusa E, Lehmann J, Lösche W. Guanylyl cyclase-independent and plasma-dependent inhibition of platelet aggregation by diazeniumdiolate. Platelets 2006; 17: 121.

Schaarschmidt A, Konter J, Reiss S, Oberle V, Claus RA, Glusa E, Lehmann J, Lösche W. Inhibition of platelet aggregation by 4-methyl piperidine NONOate is mediated by plasma factors but not by cGMP. Platelets, in press.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. W. Lösche für die Vergabe des Themas, die hilfreiche Unterstützung bei dessen Bearbeitung und die geduldige Beratung bei der Fertigstellung der Dissertation.

Weiterhin danke ich Herrn V. Oberle für die technische Unterstützung während der Versuche am Durchflusszytometer und bei Computerproblemen aller Art.

Herrn J. Konter danke ich für die Bestimmung der Halbwertszeit des 4-MEPI-NO im Phosphatpuffer.

Frank Schaarschmidt möchte ich für die wertvollen Hinweise zur Statistik danken.

Nicht zuletzt danke ich allen Blutspendern für ihre Unterstützung.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich,
dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel,
persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der
Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: PD Dr. Wolfgang Lösche,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder
unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im
Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere
wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe

und dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung
nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Münster, 19. Juli 2007